

**Umfassende Analyse der Proteinkomponenten
spliceosomaler Ribonukleoprotein-Komplexe
aus *Saccharomyces cerevisiae***

D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Alexander Gottschalk

aus
Bonn

Marburg/Lahn, September 1999

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 15. Oktober 1999 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. H. Kindl
Zweitgutachter: Prof. Dr. R. Lührmann

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden zwischen April 1996 und Juni 1999 am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung des Fachbereiches Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Reinhard Lührmann durchgeführt.

Während dieser Zeit entstanden die folgenden wissenschaftlichen Veröffentlichungen mit meiner Beteiligung:

G. Neubauer, A. Gottschalk, P. Fabrizio, B. Séraphin, R. Lührmann und M. Mann (1997)

Identification of the proteins of the yeast U1 small nuclear ribonucleoprotein complex by mass spectrometry. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 385-90

A. Gottschalk, J. Tang, O. Puig, J. Salgado, G. Neubauer, H.V. Colot, M. Mann, B. Séraphin, M.

Rosbash, R. Lührmann und P. Fabrizio (1998) A comprehensive biochemical and genetic analysis of the yeast U1 snRNP reveals five novel proteins. *RNA*, **4**, 374-93

N.J. Watkins, A. Gottschalk, G. Neubauer, B. Kastner, P. Fabrizio, M. Mann und R. Lührmann

(1998) Cbf5p, a potential pseudouridine synthase, and Nhp2p, a putative RNA- binding protein, are present together with Gar1p in all H BOX/ACA-motif snoRNPs and constitute a common bipartite structure. *RNA*, **4**, 1549-68

O. Puig, A. Gottschalk, P. Fabrizio und B. Séraphin (1999) Interaction of the U1 snRNP with nonconserved intronic sequences affects 5' splice site selection. *Genes Dev.*, **13**, 569-580

A. Gottschalk, G. Neubauer, J. Banroques, R. Lührmann und P. Fabrizio (1999) Identification by mass spectrometry and functional analysis of novel proteins of the yeast [U4/U6.U5] tri-snRNP.

EMBO J., **18**, 4535-4548

„Haben Sie schon eine Idee, Mr. Spock ?“
„Nein, Captain, nur den Anfang einer Theorie...“

Aus der TV-Serie „Raumschiff Enterprise“

INHALTSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG **7**

2 EINLEITUNG **9**

2.1	DIE PRÄ-MRNA SPLEIBREAKTION	10
2.2	DER SPLEIBOSOMENZYKLUS	12
2.3	DAS RNA/RNA-NETZWERK IM SPLEIBOSOM	14
2.3.1	DIE USNRNAS	14
2.3.2	DIE DYNAMISCHEN KONFORMATIONSÄNDERUNGEN DES RNA/RNA-NETZWERKS	16
2.4	USNRNPs UND IHRE PROTEINE	18
2.4.1	METHODEN ZUR ISOLIERUNG VON USNRNP-PROTEINEN	18
2.4.2	AUFBAU DER SNRNPs	19
2.4.2.1	Humane UsnRNP-Proteine	21
2.4.2.2	UsnRNP-Proteine der Hefe	24
2.4.3	FUNKTIONEN DER USNRNP-PROTEINE BEIM PRÄ-MRNA SPLEIßEN	26
2.5	NICHT-USNRNP-PROTEINSPLEIßFAKTOREN	27
2.6	KONZEPTION UND AUFGABENSTELLUNG	30

3 MATERIAL UND METHODEN **33**

3.1	MATERIALIEN	33
3.1.1	CHEMIKALIEN, MEDIEN, CHROMATOGRAPHIEMATERIALIEN	33
3.1.2	ORGANISMEN	33
3.1.2.1	Hefestämme (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	33
3.1.2.2	Bakterienstämme (<i>Escherichia coli</i>)	34
3.1.3	PLASMIDE	35
3.1.4	OLIGONUKLEOTIDE	36
3.1.5	NUKLEOTIDE	37
3.1.6	ANTISEREN UND MONOKLONALE ANTIKÖRPER	37
3.1.7	KITS	37
3.1.8	ENZYME UND ENZYMINHIBITOREN	38
3.1.9	GERÄTE	38
3.1.10.	ARBEITSMATERIALIEN	38
3.2	METHODEN	39

3.2.1	PROTEINBIOCHEMISCHE STANDARDMETHODEN	39
3.2.1.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	39
3.2.1.2	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCA-) Extraktion	39
3.2.1.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen	39
3.2.1.4	Western Blot und ECL (enhanced chemiluminescence) Detektion	40
3.2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN	40
3.2.2.1	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	40
3.2.2.2	Extraktion von Nukleinsäuren (PCA-Extraktion)	41
3.2.2.3	Agarosegelelektrophorese von DNA	41
3.2.2.4	Denaturierende Elektrophorese von RNA und DNA im Harnstoffgel	41
3.2.2.5	Nichtdenaturierende Gelelektrophorese von RNA-Duplices	42
3.2.2.6	Transformation von Plasmiden in Bakterien sowie deren Isolierung	42
3.2.2.7	Restriktionsverdau von Plasmiden / DNA, Reinigung von Restriktionsprodukten und Ligation	42
3.2.2.8	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	42
3.2.2.9	Detektion von Nukleinsäuren durch Northern und Southern Blot	43
3.2.2.9.1	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	44
3.2.2.10	<i>In vitro</i> Transkription	44
3.2.2.11	Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden am 5'-Ende	45
3.2.2.12	Überexpression von Fusions-Proteinen in Bakterien	45
3.2.3	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	46
3.2.3.1	Immunisierung von Kaninchen	46
3.2.3.2	Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper	46
3.2.3.3	Immunpräzipitation	46
3.2.4	ZELLKULTUR	47
3.2.4.1	Kultur von Bakterienzellen	47
3.2.4.2	Kultur von Hefezellen	48
3.2.5	SPEZIELLE METHODEN ZUR ANALYSE VON HEFE-USNRNPS UND DEREN PROTEINEN	48
3.2.5.1	Hefegenetik	48
3.2.5.1.1	Transformation von Hefezellen	49
3.2.5.1.2	Gen-Deletion durch homologe Rekombination	49
3.2.5.1.3	PCR-basierte Gen-Deletions-Strategie	49
3.2.5.1.4	Isolierung von genomischer DNA aus Hefe	49
3.2.5.1.5	Sporulation und Tetradenanalyse (nach [140])	50
3.2.5.1.6	Testen von temperatur-sensitiven Wachstumsphänotypen	50
3.2.5.1.7	Positionierung von Genen unter die Kontrolle des <i>GALI</i> Promotors	50
3.2.5.1.8	<i>In vivo</i> Fusionierung von Hefeproteinen mit der IgG-Bindungsdomäne des bakteriellen Protein A am C-Terminus	51
3.2.5.2	Detektion von <i>in vivo</i> Spleißdefekten durch Primer-Extension von Gesamt-RNA aus Hefe	52

3.2.5.3	Präparation spleißfähiger Hefe-Gesamtzellextrakte	53
3.2.5.4	<i>In vitro</i> prä-mRNA Spleißen	54
3.2.5.5	Inhibition von Spleißen <i>in vitro</i> mit Antikörpern und Komplementation der Spleißaktivität mit rekombinanten Proteinen	54
3.2.5.6	Immunaffinitätschromatographische Aufreinigung von UsnRNPs der Hefe	54
3.2.5.7	Ni-NTA-Metallaffinitätschromatographie von Hefe Gesamt-snRNPs	55
3.2.5.8	Glyzeringradienten-Zentrifugation von UsnRNPs und Gesamtzell-Extrakten der Hefe	55
3.2.5.9	Integration von Fusionsproteinen in native snRNPs <i>in vitro</i>	56
3.2.5.10	Affinitätsreinigung von Spleißosomen auf biotinylierter prä-mRNA (nach [145])	56
3.2.5.11	Oligonukleotid-gerichtete Zerstörung von snRNAs durch RNaseH	57
3.2.5.12	UV-induzierte Quervernetzung von Proteinen an prä-mRNA	57

4 RESULTATE **59**

4.1	SPEZIFISCHE AUFREINIGUNG VON USNRNPs AUS GESAMTZELLEXTRAKTEN DER BÄCKERHEFE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	59
4.2	MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE snRNP-ASSOZIIERTER PROTEINE SOWIE IDENTIFIZIERUNG IHRER GENE IN DER HEFEGENOM-DATENBANK	62
4.3	ISOLIERUNG DES U1 snRNPs UND CHARAKTERISIERUNG SEINER PROTEINKOMPONENTEN	65
4.3.1	ISOLIERUNG DES U1 snRNPs	65
4.3.2	ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DES ISOLIERTEN U1 snRNP-PARTIKELS	69
4.3.3	MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE DER U1 snRNP-PROTEINE	71
4.3.4	SEQUENZEN, MOTIVE UND CHARAKTERISTIKA DER NEUEN U1 snRNP-ASSOZIIERTEN PROTEINE	73
4.3.5	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER NEUEN U1 snRNP PROTEINE	76
4.3.5.1	Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen Snu71p, Nam8p, Snu56p und Npl3p	76
4.3.5.2	Snu71p, Nam8p und Snu56p sind spezifisch und stabil mit dem U1 snRNP assoziiert	77
4.3.5.3	<i>In vivo</i> Gen-Deletion ("Knockout") von <i>SNU71</i> , <i>NAM8</i> und <i>SNU56</i>	78
4.3.5.4	ΔNam8p-U1 snRNP enthält ein neues Protein, Prp42p/Snu65p, und ist im Vergleich zum Wildtyp-U1 snRNP deutlich destabilisiert	80
4.3.6	ZUSAMMENFASSUNG	84
4.4	BIOCHEMISCHE ISOLIERUNG DES [U4/U6.U5] TRI-snRNPs UND CHARAKTERISIERUNG NEUER TRI-snRNP PROTEINE	85
4.4.1	PRÄPARATIVE AUFREINIGUNG DES [U4/U6.U5] TRI-snRNPs	85
4.4.1.1	Glyzeringradienten-Zentrifugation des [U4/U6.U5] tri-snRNP Eluats	87
4.4.2	MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE DER PROTEINE DES [U4/U6.U5] TRI-snRNPs	89

4.4.2.1	Sm ähnliche (Lsm) Proteine im [U4/U6.U5] tri-snRNP	91
4.4.2.2	Identifikation neuer [U4/U6.U5] tri-snRNP-spezifischer Proteine	93
4.4.3	SEQUENZANALYSE DER NEU IDENTIFIZIERTEN, POTENTIELLEN TRI-SNRNP PROTEINE	94
4.4.4	ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ANALYSE DES [U4/U6.U5] TRI-SNRNPs DER HEFE	97
4.4.5	FUSIONIERUNG DER POTENTIELLEN NEUEN snRNP-PROTEINE <i>IN VIVO</i> MIT DER IgG-BINDENDEN DOMÄNE DES BAKTERIELLEN PROTEIN A	98
4.4.6	IMMUNPRÄZIPITATIONSSTUDIEN MIT DEN PROTEIN A-FUSIONIERTEN snRNP-PROTEINEN	99
4.4.6.1	Snu66p, Spp381p und Snu23p sind mit [U4/U6.U5] tri-snRNPs und [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNPs assoziiert	100
4.4.6.2	Snu66p und Spp381p assoziieren primär mit dem U5 snRNP, während Snu23p primär das U4 snRNP bindet	102
4.4.7	FUNKTIONEN VON SNU66P, SPP381P UND SNU23P IM PRÄ-MRNA SPLEIßEN <i>IN VITRO</i>	105
4.4.8	SPP381P UND SNU23P SIND AM SPLEIßEN <i>IN VIVO</i> BETEILIGT	108
4.4.9	SNU66P UND SNU23P, JEDOCH NICHT SPP381P, SIND <i>IN VITRO</i> STABIL MIT SPLEIßOSOMEN ASSOZIIERT	109
4.4.10	ZUSAMMENFASSUNG	113
4.5	DAS [U2.U4/U6.U5] TETRA-SNRNP IST EIN DYNAMISCHER KOMPLEX	115
4.5.1	SNU66P, SPP381P UND SNU23P DISSOZIIEREN BEI INKUBATION DES EXTRAKTES MIT ATP REVERSIBEL VOM [U2.U4/U6.U5] TETRA-SNRNP AB	115
4.5.2	ISOLIERTE [U2.U4/U6.U5] TETRA-SNRNPs DISSOZIIEREN BEI INKUBATION MIT ATP IN FREIE U2, U5, U4/U6 UND TEILWEISE FREIE U4 UND U6 snRNPs	117
4.6	PROTEINZUSAMMENSETZUNG DES FREIEN U5 snRNPs DER HEFE	121
4.6.1	AAR2P IST SPEZIFISCH MIT DEM FREIEN U5 snRNP ASSOZIIERT	121
4.6.2	<i>IN VIVO</i> FUSION VON AAR2P MIT EINEM DEKAHISTIDIN-PEPTID AM C-TERMINUS	124
4.6.2.1	AAR2 ist ein essentielles Gen	124
4.6.3	BIOCHEMISCHE ISOLIERUNG DES AAR2P-ASSOZIIERTEN, FREIEN U5 snRNPs	126
4.6.4	GLYZERINGRADIENTEN-ZENTRIFUGATION DES [U4/U6.U5] TRI-SNRNPs DER HEFE BEI ERHÖHTEN SALZKONZENTRATIONEN (400 mM KCl)	130
4.6.5	ZUSAMMENFASSUNG	133
4.7	IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG NEUER U2 snRNP-SPEZIFISCHER PROTEINE	135
4.7.1	ANALYSE DER SEQUENZEN VON RSE1P UND SNU17P	135
4.7.2	RSE1P UND SNU17P SIND SPEZIFISCH MIT DEM U2 snRNP ASSOZIIERT	137
4.7.3	RSE1P UND SNU17P ASSOZIIEREN <i>IN VITRO</i> STABIL MIT DEM SPLEIßOSOM	138
4.7.4	SNU17P BINDET WÄHREND DER SPLEIßREAKTION <i>IN VITRO</i> DIREKT AN DIE PRÄ-MRNA	139
4.7.5	DIE GEN-DELETION VON <i>SNU17</i> ERZEUGT EINEN TEMPERATURSENSITIVEN PHÄNOTYP	140
4.7.6	DIE SPLEIßAKTIVITÄT IM <i>SNU17Δ</i> EXTRAKT IST STARK BEEINTRÄCHTIGT, TEMPERATURABHÄNGIG UND WIRD DURCH ZUGABE VON REKOMBINANTEM GST-SNU17P REKONSTITUIERT	141

4.7.7	ZUSAMMENFASSUNG	143
5	DISKUSSION	145
5.1	DAS U1 snRNP UND SEINE PROTEINKOMPONENTEN	146
5.1.1	BIOCHEMIE UND GENETIK KORRELIEREN BEI DER IDENTIFIZIERUNG VON U1 snRNP-PROTEINEN	148
5.1.2	FUNKTIONELLE ANALYSE DER NEUEN HEFE-U1 snRNP-PROTEINE	149
5.2	DAS [U4/U6.U5] TRI-snRNP UND SEINE PROTEINKOMPONENTEN	152
5.2.1	SIEBEN LSM PROTEINE SIND BESTANDTEIL DES [U4/U6.U5] TRI-snRNPs DER HEFE	154
5.2.2	NEUE [U4/U6.U5] TRI-snRNP-PROTEINE IN DER HEFE	156
5.2.2.1	Dib1p/Snu16p	156
5.2.2.2	Snu13p	157
5.2.2.3	Snu66p, Spp381p und Snu23p	158
5.3	IDENTIFIZIERUNG UND MÖGLICHE FUNKTION EINES [U2.U4/U6.U5] TETRA-snRNP-KOMPLEXES	160
5.4	CHARAKTERISIERUNG DES FREIEN U5 snRNPs DER HEFE UND MÖGLICHE FUNKTION DES U5 snRNP-PROTEINS AAR2P	162
5.5	IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG NEUER U2 snRNP-PROTEINE	165
5.6	FOLGERUNGEN UND AUSBLICK	167
6	LITERATURVERZEICHNIS	169
7	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	179
8	DANKSAGUNG	181
9	ERKLÄRUNG	183

1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Spleißosom ist ein Ribonukleoprotein-Komplex, der die Introns aus den eukaryontischen prä-mRNAs entfernt und die kodierenden Exons verknüpft. Das Spleißosom wird auf jedem Intron aus fünf snRNPs (small nuclear ribonucleo-proteins) aufgebaut und katalysiert zwei Phosphotransesterifizierungsreaktionen. Die snRNPs bestehen aus je einem (sn)RNA-Molekül und zahlreichen Proteinen, deren Funktionen die snRNA-katalysierte Spleißreaktion erst ermöglichen.

Um funktionelle Zusammenhänge im Spleißosom zu untersuchen, werden in der Hefe *S.cerevisiae* genetische Methoden angewendet. Um zuvor die Gene spleißosomaler Proteine zu ermitteln, müssen die snRNPs isoliert und die Proteinkomponenten identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden biochemische Methoden zur effizienten Isolierung eines bestimmten snRNPs entwickelt. Dazu wurden zunächst alle snRNPs durch Immunaффinitätschromatographie mit Antikörpern gereinigt, welche die 5'-terminale Kappenstruktur der snRNAs binden. Aus der erhaltenen Mischung wurde ein bestimmtes snRNP durch Bindung an immobilisierte Ni(II)-Ionen isoliert. Dessen isolierte Proteine wurden dann mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden sequenziert und deren Gene in der Hefegenomdatenbank identifiziert.

Zunächst wurde das U1 snRNP isoliert. Dieses enthielt 17 Proteine, darunter acht, deren Assoziation mit dem U1 snRNP zuvor unbekannt war. Das Hefe-U1 snRNP ist somit viel komplexer aufgebaut, als sein humanes Gegenstück, was funktionelle Unterschiede zwischen den beiden Spezies in den Vorgängen zu Beginn der Spleißosomassemblierung widerspiegelt.

Als nächstes wurde das größte snRNP, das [U4/U6.U5] tri-snRNP (1,5 MDa) isoliert. Dieses enthielt 28 Proteine, darunter neun vormals unbekannte. Drei dieser Proteine (Snu66p, Spp381p und Snu23p) wurden funktionell charakterisiert: Ihre Depletion oder Inaktivierung inhibiert das prä-mRNA-Spleißen. Während Snu66p und Snu23p Bestandteile des aktiven Spleißosoms sind, ist Spp381p womöglich nur an dessen Formierung beteiligt. Die Dissoziation des tri-snRNPs durch Salzbehandlung und die Isolierung des freien U5 snRNPs zeigten, daß sich das Hefe-tri-snRNP strukturell von seinem humanen Gegenstück unterscheidet.

Desweiteren konnte ein tetramerer Komplex, bestehend aus den U2, U4, U5 und U6 snRNPs, charakterisiert werden. Dieser Komplex ist dem Spleißosom in seiner Zusammensetzung sehr ähnlich, enthält jedoch keine prä-mRNA. Dieses tetra-snRNP könnte als isolierbares Modell-Partikel zur Untersuchung spleißosomaler Konformationsänderungen dienen. Schließlich wurden auch zwei neue U2 snRNP-spezifische Proteine identifiziert und ihre Bedeutung für die Spleißreaktion genetisch und biochemisch untersucht.

Anhand von multifaktoriellen Ribonukleoproteinkomplexen, den snRNPs, konnten in dieser Arbeit erstmals Methoden etabliert werden, die eine funktionelle Proteomanalyse mit Hilfe der Massenspektrometrie ermöglichen. Diese Arbeit führte zu einer umfassenden Aufklärung der Proteinausstattung der Hefe-snRNPs. Damit ist ein Grundstein für die detaillierte funktionelle Analyse dieser Proteine und snRNP-Komplexe gelegt.

2 EINLEITUNG

Nahezu alle Gene der höheren Eukaryonten, sowie einige Gene der Bäckerhefe, sind diskontinuierlich aus kodierenden (exprimierten) Abschnitten, den sogenannten Exons, und nichtkodierenden Introns aufgebaut. Auch in der primären Genabschrift, der prä-mRNA, finden sich diese Introns wieder. Damit diese prä-mRNA als Matrize zur Synthese eines funktionellen Proteins verwendet werden kann, müssen die Introns entfernt und die Exons exakt zusammengeführt – ligiert – werden. Dieser Prozeß, das prä-mRNA Spleißen, wird im Zellkern von einem ca. 50-60S großen Ribonukleoproteinkomplex, dem Spleißosom, katalysiert [1-4]. Das Spleißosom besteht aus fünf Untereinheiten, den U1, U2, U4, U5 und U6 snRNPs (engl.: uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins), die jeweils aus einem RNA-Molekül und zahlreichen Proteinen aufgebaut sind.

Die Introns enthalten konservierte Sequenzelemente, die dem Spleißosom als Erkennungsmerkmale dienen und den Anfang und das Ende des Introns markieren. Die fünf UsnRNPs binden in einer definierten Reihenfolge an die prä-mRNA, so daß auf jedem Intron, unter Einbeziehung weiterer Proteine, ein Spleißosom aufgebaut wird. Dabei wird das 5'-Ende des Introns (die 5'-Spleißstelle) zunächst vom U1 snRNP gebunden [5, 6]. Im nächsten Schritt bindet das U2 snRNP eine Region der prä-mRNA in der Nähe der 3'-Spleißstelle [7]. Zur Bildung des Spleißosoms bindet schließlich ein vorgeformter, trimerer Komplex aus den U4, U5 und U6 snRNPs an die prä-mRNA. Es kommt zur Ausbildung eines komplexen RNA/RNA-Netzwerks [8], das im Laufe der Spleißreaktion starken Konformationsänderungen unterliegt. Nachdem die Reaktion vollzogen ist, werden die ligierten Exons sowie das herausgeschnittene Intron freigesetzt, das Spleißosom zerfällt in seine Untereinheiten und die UsnRNPs werden für neue Spleißreaktionen herangezogen.

Die Erforschung des in seinen Grundzügen evolutionär konservierten Spleißprozesses konzentriert sich im wesentlichen auf zwei Organismen, den Menschen und die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. In den vergangenen 15 Jahren wurden außer den UsnRNAs zahlreiche UsnRNP-assoziierte Proteine identifiziert. Im Humansystem lassen sich die UsnRNP-Partikel gut mit biochemischen Methoden untersuchen. Die funktionelle Charakterisierung der snRNP-Proteine läßt sich jedoch effizienter in der Hefe bewerkstelligen, da hier gezielt genetische Methoden angewendet werden können. Wegen der geringen Mengen von snRNPs in der Hefezelle ist hier aber die Anwendung biochemischer Methoden schwieriger. Die Kombination genetischer und biochemischer Methoden in demselben Organismus wäre jedoch der Idealfall und sollte sich in der Hefe durch die Entwicklung biochemischer Methoden zur Isolierung und Charakterisierung der UsnRNPs verwirklichen lassen.

Im folgenden sollen die Grundzüge der prä-mRNA Spleißreaktion, sowie der Aufbau und die Funktionen der daran maßgeblich beteiligten UsnRNPs erläutert werden.

2.1 Die prä-mRNA Spleißreaktion

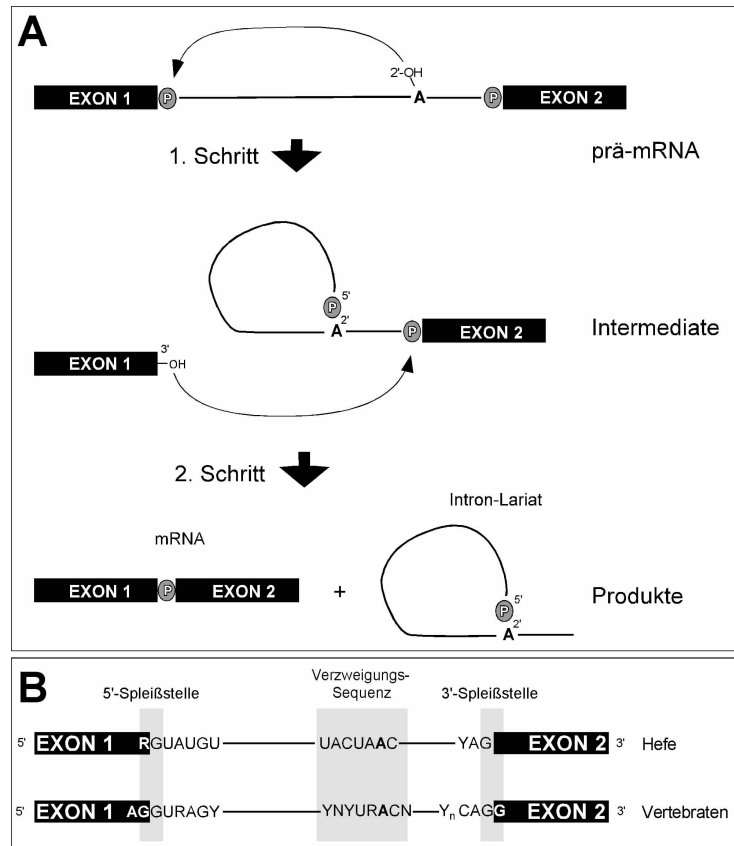


Abb. 1: Mechanistische Abfolge der beiden vom Spleißosom katalysierten Reaktionsschritte

A: Bei der prä-mRNA Spleißreaktion finden zwei einander nachgeschaltete Phosphotransesterifizierungsreaktionen statt (siehe Text). **B:** Vergleich der konservierten Sequenzen der Introns in der Hefe und bei Vertebraten (5'-Spleißstelle, Verzweigungs-Sequenz, 3'-Spleißstelle). Bei den Vertebraten gibt es stromabwärts der Verzweigungs-Sequenz eine Pyrimidinreiche Region. Y = Pyrimidin, R = Purin, N = irgendein Nukleotid. Das Verzweigungs-Adenosin ist fett gedruckt.

Rein mechanistisch betrachtet handelt es sich bei der prä-mRNA Spleißreaktion um zwei aufeinanderfolgende, stereospezifische Phosphotransesterifizierungsreaktionen des Phosphodiester-Rückgrates der prä-mRNA (Abb. 1; [9]). Diese werden vermutlich im wesentlichen durch die snRNAs katalysiert. Im ersten Schritt der Spleißreaktion greift dabei der 2'-Hydroxylsauerstoff eines konservierten Adenosins, welches in der Nähe des 3'-Endes des Introns lokalisiert ist und Verzweigungs- oder Branchpoint-Adenosin genannt wird, nukleophil am Phosphoratom der 5'-Spleißstelle an. In einer S_N2 -Reaktion fungiert die 3'-Hydroxylgruppe des 5'-Exons als Abgangsgruppe. Dabei wird zwischen dem ersten Nukleotid des Introns und dem Verzweigungsadenosin eine kovalent verzweigte „Lasso“-Struktur (engl.: lariat) mit einer 5'-2'-Phosphodiesterbindung gebildet. Das nun abgespaltene 5'-Exon trägt eine 3'-terminale Hydroxylgruppe und bleibt fest an das Spleißosom gebunden. Im zweiten Schritt der Spleißreaktion greift der Sauerstoff dieser 3'-Hydroxylgruppe nukleophil das Phosphoratom der 3'-Spleißstelle an. Dies resultiert in der Ligation der beiden

Exons und dem Heraustrennen des verzweigten Introns aus der prä-mRNA (wiederum nach einem S_N2 -Mechanismus).

Eine RNA-Spleißreaktion, die den gleichen Chemismus verwendet, wird von den mitochondrialen, selbstspleißenden Introns der Gruppe II ausgeführt [10]. Im Gegensatz zum Spleißosom sind hier jedoch Substrat und katalytisches Zentrum in einem Molekül vereinigt. An dieser Reaktion sind (zumindest *in vitro*) keine Proteine beteiligt, und sie braucht, aufgrund der ausgeglichenen Bilanz von Bindungsbrüchen und -formierungen, keine exogen zugeführte Energie. Die Gruppe II Introns bilden durch intramolekulare Basenpaarungen ein hoch strukturiertes, dreidimensionales RNA-Netzwerk aus, das die reaktiven Gruppen in einer für die Katalyse der Reaktion günstigen Konformation zusammenführt [11]. Die "Information", die nötig ist, um die Spleißreaktion auf das Nukleotid genau durchzuführen, ist bei den Gruppe II Introns also in den hoch konservierten Intronsequenzen enthalten. Die starke Konservierung der Intron-Sequenzen schließt jedoch von vornherein eine Regulierbarkeit der Spleißreaktion aus.

Dagegen katalysiert das Spleißosom die Exzisionsreaktion einer Vielzahl verschiedener Introns, deren kurze Erkennungssequenzen noch dazu sehr variabel sind. Dies ermöglicht eine Regulierbarkeit der Spleißreaktion: Beim alternativen Spleißen können verschiedene Spleißstellen in einer prä-mRNA unterschiedlich miteinander kombiniert werden, so daß unterschiedliche Endprodukte entstehen. Der Gewinn an Möglichkeiten zur Regulation der Spleißreaktion geht notwendigerweise mit einem Verlust an "Information" in den Introns einher. Um die Genauigkeit in der Definition der variablen Spleißstellen zu gewährleisten, muß beim Spleißosom die "Information" vom Substrat auf die katalytische Maschinerie - *in trans* - übertragen werden [12]. Es wird vermutet, daß die UsnRNAs der spleißosomalen Maschinerie evolutionär aus den Gruppe II Introns hervorgegangen sind. Alternativ könnte jedoch eine parallel verlaufende Evolution bei spleißosomalen Introns und Gruppe II Introns zum gleichen Chemismus geführt haben, da dieser vielleicht die beste Möglichkeit darstellt, eine bestimmte Sequenz aus einem RNA-Transkript zu entfernen [11].

Das Spleißosom muß die spezifischen Sequenzen des Introns erkennen, um die Reaktionen auf das Nukleotid genau katalysieren zu können. Diese Sequenzsignale werden von den snRNP-Untereinheiten (z.B. durch Basenpaarung mit ihren snRNAs) erkannt, während das Spleißosom aufgebaut wird. Die konservierten Sequenzbereiche der Introns [13] seien hier kurz erläutert:

Die **5'-Spleißstelle**: Sie besteht in der Hefe nahezu invariabel aus der Sequenz R/GUAUGU (der Schrägstrich markiert die Spleißstelle, fett gedruckte Nukleotide symbolisieren eine Konserviertheit von über 90%, R steht für ein Purin). In höheren

Eukaryonten ist diese Erkennungssequenz variabler: AG/**GUR**AGY, wobei das **GU**-Dinukleotid invariabel den Anfang des Introns markiert (Y steht für ein Pyrimidin).

Die 3'-Spleißstellenregion setzt sich aus drei Sequenzbereichen zusammen:

1. Die **3'-Spleißstelle**: Hefe-Introns enden zumeist auf **YAG**/, wobei das **AG**-Dinukleotid invariabel ist (in höheren Eukaryonten **CAG**/G).
2. Die **Verzweigungsstelle (Branchpoint)**: Diese Sequenz befindet sich zumeist in kurzem Abstand zur 3'-Spleißstelle und enthält das Verzweigungs-Adenosin (unterstrichen), das in die invariable Sequenz **UACUAACA** eingebettet ist. In höheren Eukaryonten ist die Sequenz variabler (**YNYURACN**; N kann jedes Nukleotid sein)
3. Der **Polypyrimidin-Trakt**: In höheren Eukaryonten findet man zwischen Branchpointsequenz und 3'-Spleißstelle eine ca. 10-15 Nukleotide (nt) lange Region von Pyrimidinen, die in Hefe-Introns nur sehr schwach ausgeprägt ist oder garnicht vorkommt.

Der Vergleich der Konsensussequenzen der Introns in Mensch und Hefe zeigt Unterschiede auf. Die geringere Variabilität der 5'-Spleißstellen in der Hefe rührt vermutlich daher, daß reguliertes Spleißen in der Hefe fast nicht vorkommt. Hier hat schon die Veränderung einer einzelnen Base in der 5'-Spleißstellensequenz dramatische Folgen für die Effizienz, mit der diese Spleißstelle vom Hefe-Spleißosom erkannt wird. Die Introns in Hefe und Mensch unterscheiden sich auch in Länge und Abundanz. Hefe-Introns sind zumeist nicht länger als 400 Nukleotide (nt), selten bis zu 1000 nt. Im gesamten Hefe-Genom finden sich nur ca. 260 Introns, und bis auf eine Ausnahme (das *MATa1*-Gen) findet sich nur jeweils ein Intron pro Gen, das zumeist nahe des 5'-Endes liegt [13]. In Eukaryonten enthalten fast alle Proteinkodierenden Gene Introns (im Mittel ca. 10, teils jedoch bis zu 50) und diese variieren in ihrer Länge von unter 100 bis zu ca. 100.000 nt. Dagegen sind die Exons meist nur wenige 100 nt lang. Dies verdeutlicht eindrucksvoll, wie genau die Spleißmaschinerie arbeiten muß, um die sehr kurzen Konsensussequenzen der Introns zuverlässig zu erkennen.

Um die Spleißreaktion erfolgreich durchzuführen, müssen drei Bedingungen erfüllt sein: 1. Die Spleißstellen müssen erkannt werden; 2. Sie müssen in eine Konformation gebracht werden, die eine genaue Ligation der Exons erlaubt; 3. Die Transesterifizierungsreaktionen müssen katalysiert werden. Diese Aufgaben werden bei der trans-aktiven Spleißmaschinerie von den snRNPs übernommen.

2.2 Der Spleißosomenzyklus

Die prä-mRNA Spleißreaktion umfaßt in einer zyklischen, geordneten Abfolge die Bildung verschiedener Komplexe von UsnRNPs mit der prä-mRNA. Dieser Zyklus ist in Abb. 2 dargestellt. Die einzelnen spleißosomalen Komplexe können *in vitro* charakterisiert

werden. Dazu wird eine radioaktiv markierte prä-mRNA mit einem spleißfähigen Zellextrakt inkubiert. Hierbei bilden sich auf der prä-mRNA verschiedenen Spleißkomplexe aus. Diese können dann durch Elektrophorese unter nativen Bedingungen aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert werden [14]. Dadurch läßt sich auch die zeitliche Abfolge der Komplexbildung studieren. In der Hefe können Mutationen in bestimmten Proteinen dazu benutzt werden, bestimmte Spleißkomplexe zu akkumulieren. Die einzelnen Komplexe können auf ihren Gehalt an bestimmten snRNPs sowie dem Spleißsubstrat, Zwischenstufen und Produkten der Spleißreaktion untersucht werden.

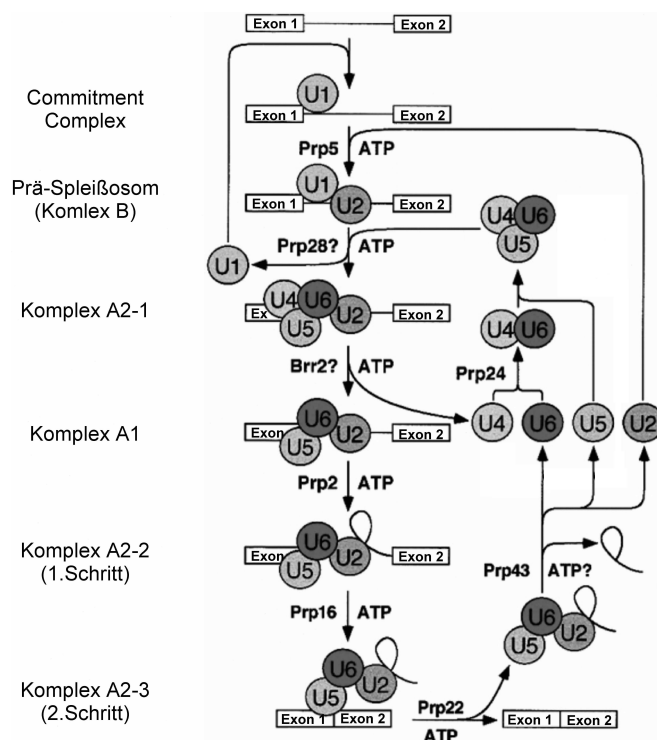


Abb. 2: Modell des prä-mRNA Spleißzyklus in der Hefe

Das Spleißosom wird in einer definierten Abfolge auf jedem einzelnen Intron aus seinen Untereinheiten aufgebaut. Zunächst bindet das U1 snRNP an die 5'-Spleißstelle, durch die Bindung zusätzlicher Faktoren kommt es zur Formierung des sog. Commitment-Komplexes (siehe auch Abb. 8 B). Anschließend bindet das U2 snRNP an die Verzweigungs-Sequenz und es kommt so zur Bildung des Prä-Spleißosoms. Dann bindet im nächsten Schritt das vorgeformte [U4/U6.U5] tri-snRNP, um das Spleißosom zu bilden. Durch mehrere Umlagerungen (siehe Abb. 4) wird das Spleißosom aktiviert und katalysiert die beiden Reaktionen. Anschließend werden die Produkte freigesetzt und das Spleißosom zerfällt wieder in seine Untereinheiten, die dann für eine weitere Spleißreaktion bereit sind. Das tri-snRNP wird dazu wieder aus seinen Untereinheiten re-formiert, Prp24p bewerkstelligt zuvor die Bildung des U4/U6 snRNP Dimers. Die Vollendung eines Spleißzyklus erfordert Energie in Form von ATP, die verschiedenen Umlagerungen werden durch unterschiedliche Proteine (insbesondere der DEXD/H-Familie von RNA-Helikasen) katalysiert.

SnRNPs sind als Kreise symbolisiert, die Benennung der einzelnen Komplexe folgt der für das Hefe-System benutzten Nomenklatur. In der im Human-System verwendeten Nomenklatur werden diese Komplexe in der Reihenfolge ihrer Bildung E- (early Komplex), A- (Prä-Spleißosom), B- (voll assembliertes Spleißosom vor seiner Aktivierung) und C-(aktives Spleißosom) Komplexe genannt. Nach [3].

Der erste detektierbare Komplex eines snRNPs mit der prä-mRNA, der Commitment-Komplex, enthält nur das U1 snRNP, die prä-mRNA und einige weitere Proteine ([15]; Abb. 8 B). Eine prä-mRNA, die in diesem Komplex gebunden ist, wird daraus nur entlassen, wenn sie die Spleißreaktion durchläuft [16]. Als nächstes bindet das U2 snRNP an die Verzweigungs-Sequenz, um das Prä-Spleißosom zu bilden (B-Komplex; [14, 17]). Die Bindung des [U4/U6.U5] tri-snRNPs an das Prä-Spleißosom führt dann zur Bildung des Komplexes A2-1. Die U4 und U6 snRNAs sind im tri-snRNP durch ausgiebige Basenpaarung ihrer snRNAs komplexiert. Zur Aktivierung des Spleißosoms muß diese Basenpaarung aufgelöst werden [18]. Im Laufe dieser Umlagerungen dissoziieren die U1 und U4 snRNPs aus dem Spleißosom und es wird der Komplex A1 gebildet. Nun können die beiden Schritte

der Reaktion katalysiert werden, was mit weiteren konformationellen Umlagerungen verbunden ist. Hierbei werden die beiden Komplexe A2-2 und A2-3 gebildet. Nach Beendigung der Katalyse kommt es zur Freisetzung der Spleißprodukte, zum Zerfall des postspleißosomalen Komplexes und zur Wiederverwertung der UsnRNPs für neue Spleißreaktionen. Zuvor werden die U4 und U6 snRNPs durch erneute Ausbildung der U4/U6 RNA-Helices komplexiert [19]. Sie assemblieren dann mit dem freien U5 snRNP, um das tri-snRNP zu reformieren.

2.3 Das RNA/RNA-Netzwerk im Spleißosom

Die UsnRNAs bilden im Spleißosom durch Basenpaarungen untereinander und mit der prä-mRNA ein RNA/RNA-Netzwerk aus, das Die zahlreichen Umlagerungen unterliegt (Abb. 4; [8]). Dieses RNA/RNA-Netzwerk und seine konformationellen Umlagerungen sollen hier kurz erläutert werden. Zunächst werden die einzelnen UsnRNAs und ihre Strukturen beschrieben.

2.3.1 Die UsnRNAs

Man unterscheidet fünf spleißosomale UsnRNAs unterschiedlicher Länge: U1, U2, U4, U5 und U6 snRNA; U5 kommt in der Hefe in zwei Formen vor (U5L und U5S) wobei U5 S durch endonukleolytische Prozessierung am 3'-Ende aus U5L hervorgeht (Tab. 1; [20]). Die snRNAs U1-U5 sind RNA-Polymerase II-Transkripte und tragen als solche anfänglich eine 7-N-Methylguanosin (m^7G)-Kappe am 5'-Ende. Sie werden nach ihrer Transkription zunächst ins Cytoplasma exportiert und binden dort eine bestimmte Klasse von Proteinen, die diesen UsnRNPs gemeinsam sind (die sogenannten Sm Proteine, siehe 2.4.2). Die m^7G -Kappe wird dann zu einer 2,2,7-Trimethylguanosin (m_3G)-Kappe hypermethyliert [21]. Die sogenannten "core" snRNPs werden dann in den Kern reimportiert, wo sie mit weiteren Proteinen assemblieren. Die U6 snRNA unterscheidet sich von den anderen snRNAs: Sie besitzt als RNA-Polymerase III-Transkript eine γ -Monomethylphosphat-Kappe, verläßt vermutlich nie den Zellkern [22] und ist auch nicht mit den Sm Proteinen assoziiert.

UsnRNA	Länge beim Menschen [nt]	Länge in der Hefe [nt]
U1	164	568
U2	187	1175
U4	145	160
U5 L	116	214
U5 S	-	179
U6	106	112

Tab. 1: Längen der UsnRNAs in Mensch und Hefe

Beim Menschen gibt es ca. 10 verschieden lange U5 snRNAs, von denen hier nur eine vermerkt ist. Die Hefe-U5 S RNA geht aus U5 L durch posttranskriptionale Prozessierung hervor (nt = Nukleotide).

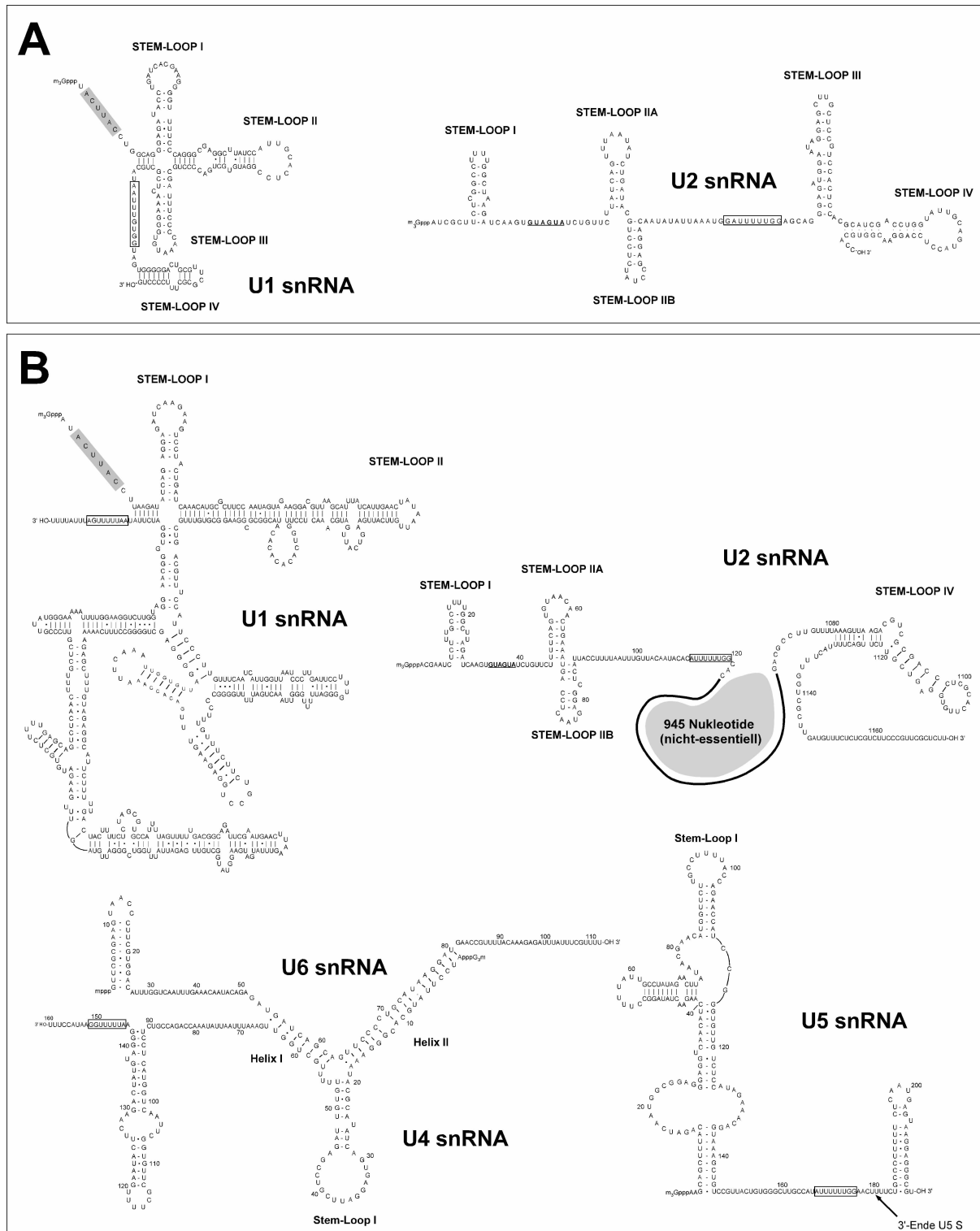


Abb. 3: Vergleich der Sequenzen und Sekundärstrukturen der UsnRNAs in Mensch und Hefe

Sequenzen und Sekundärstrukturen der snRNAs. Die Haarnadelschleifen sind nach der gängigen Nomenklatur benannt, die Sm-Bindungsstellen sind eingerahmt, die Branchpoint-bindende Sequenz der U2 snRNAs ist jeweils unterstrichen, die 5'-Spleißstellen-bindenden Sequenzen der U1 snRNAs sind grau unterlegt. **A:** Die menschlichen U1 und U2 snRNAs. **B:** Hefe U1, U2, U4, U5 und U6 snRNAs. Die U1 und U2 snRNAs unterscheiden sich durch lange Insertionen von ihren menschlichen Gegenstücken (siehe A). Die U4, U5 und U6 snRNAs sind besser konserviert und daher nur für die Hefe gezeigt. Die U4 und U6 snRNAs bilden zwei intermolekulare Helices aus.

Die Sequenzen der UsnRNAs erlauben die Bildung ausgedehnter Sekundärstrukturen, so z.B. Haarnadelschleifen, die von einzelsträngigen Regionen unterbrochen sind (siehe Abb.

3). Bestimmte Strukturen dienen dabei als Bindungsstellen für Proteine, einzelsträngige Bereiche können Basenpaarungen mit anderen snRNAs oder dem Spleißsubstrat eingehen. Eine besondere Bedeutung kommt der ausgedehnten Basenpaarung der U4 und U6 snRNAs zu. Diese bilden durch zwei intermolekulare Helices, sowie eine intramolekulare Helix der U4 snRNA eine Y-förmige Interaktionsdomäne aus (siehe unten). Alle UsnRNAs (außer U6) besitzen ein Sequenzmotiv, das als Bindungsstelle für die Sm Proteine dient. Es handelt sich dabei um eine kurze Sequenz des losen Konsensus RA(U)₃₋₆GR, die zumeist von Haarnadelstrukturen flankiert wird. Die UsnRNAs werden posttranskriptional an vielen Positionen modifiziert, z.B mit Pseudouridinen oder 2'-O-Methylgruppen.

Die UsnRNAs sind evolutionär zum Teil hoch konserviert. Dies ist am deutlichsten bei der U6 snRNA ausgeprägt, was eine essentielle Funktion dieser RNA im katalytischen Zentrum des Spleißosoms vermuten läßt. Es wird angenommen, daß die U4 snRNA durch ihre Basenpaarung mit U6 als negativer Regulator der katalytisch aktiven Bereiche der U6 snRNA dient, da die U4/U6-Helices im Laufe der Spleißosomaktivierung aufgelöst werden (siehe 2.3.2). Auch die U4 und U5 snRNAs weisen stark konservierte Sequenzen und Sekundärstrukturen auf. Die U1 und U2 snRNAs der Hefe unterscheiden sich allerdings deutlich von denen der höheren Eukaryonten. Sie sind um ein Vielfaches länger und besitzen neben Sekundärstrukturregionen, die sich auch in den humanen Gegenstücken finden, extensive, hoch strukturierte Insertionen. Interessanterweise konnte aber durch Deletionen gezeigt werden, daß diesen Hefe-spezifischen Regionen keine essentielle Bedeutung zukommt [23, 24].

2.3.2 Die dynamischen Konformationsänderungen des RNA/RNA-Netzwerks

Zu Beginn der Spleißosomassemblierung bildet die U1 snRNA mit ihrem 5'-Ende eine kurze Helix mit der 5'-Spleißstelle des Introns aus. Das U2 snRNP bindet dann, ebenfalls durch Basenpaarung, mit der konservierten GUAGUA-Sequenz der U2 snRNA an die Verzweigungssequenz des Introns. Das Verzweigungs-Adenosin wird dabei in eine für die Katalyse des ersten Schrittes essentielle, aus der Helix "ausgestülpte" Position gezwungen, da nur die umgebenden Nukleotide, aber nicht das Adenosin selbst, mit der U2 snRNA hybridisieren. Nach der Bindung des tri-snRNPs an die prä-mRNA kommt es zur Aktivierung des Spleißosoms. Hierzu, sowie zur Auflösung des postsplicisomalen Komplexes, müssen bestimmte snRNA/snRNA- bzw. snRNA/prä-mRNA-Helices gebildet und andere aufgelöst werden [3]:

1. Die U4/U6-Helices im tri-snRNP, sowie eine intermolekulare U2 snRNA-Helix werden aufgelöst [25] und es kommt zur Ausbildung neuer Helices zwischen den U2 und U6

- snRNAs. Das U4 snRNP wird aus dem Spleißosom entlassen und spielt bei der eigentlichen Katalyse keine Rolle [26].
2. Gleichzeitig damit wird die U1 snRNA/5'-Spleißstellen-Helix aufgelöst und durch eine U6 snRNA/5'-Spleißstellen-Helix ersetzt. Dabei wird die Wechselwirkung des U1 snRNPs mit dem Spleißosom geschwächt und es dissoziiert ebenfalls vom Spleißosom ab.
 3. Weitere Umlagerungen betreffen die U5 snRNA: Diese geht mit Nukleotiden ihrer großen Haarnadelschleife (Loop I) kurz vor dem ersten katalytischen Schritt eine Wechselwirkung mit den terminalen Nukleotiden des 5'-Exons ein. Beim zweiten Katalyseschritt kommt hier noch eine Wechselwirkung mit den ersten Nukleotiden des 3'-Exons hinzu, so daß die U5 snRNA eine Funktion bei der Verankerung und korrekten Positionierung der beiden Exons kurz vor dem Ligationsschritt übernimmt [27]. Interessanterweise konnte aber gezeigt werden, daß dieser Bereich der U5 snRNA nicht essentiell für die Spleißreaktion ist, so daß noch weitere Faktoren für die Verankerung der Exons sorgen müssen [28, 29]. Auch eine Basenpaarung des ersten und des letzten Nukleotids des Introns konnte nachgewiesen werden [30].
 4. Nach Beendigung der Spleißreaktion müssen die Basenpaarungen der U6 snRNA mit der 5'-Spleißstelle und die der U2 snRNA mit der Verzweigungssequenz aufgelöst werden, damit der postspleißosomale Komplex zerfallen, die Reaktionsprodukte freigesetzt und die snRNPs neuen Runden der Spleißreaktion zugeführt werden können.

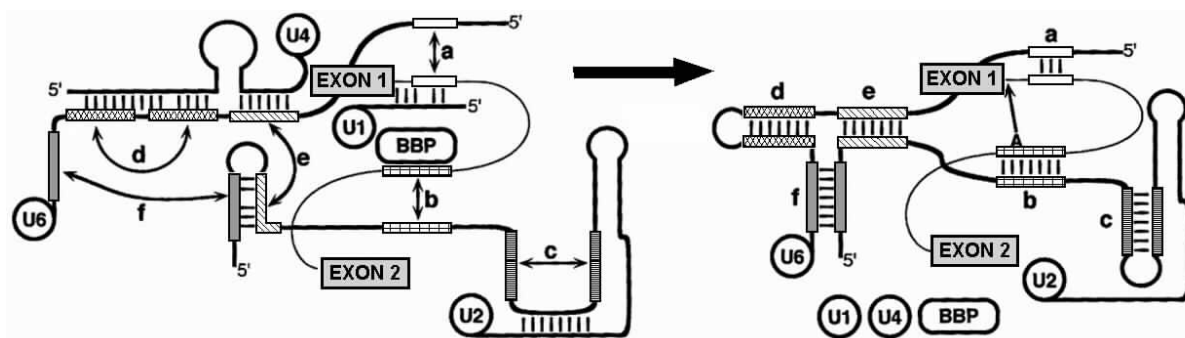


Abb. 4: Schematische Darstellung der Umlagerungen im RNA-Netzwerk des assemblierten Spleißosoms vor und nach seiner Aktivierung

Die an den Umlagerungen (Auflösungen bestimmter RNA/RNA-Helices und die Bildung neuer Helices) beteiligten RNA-Bereiche sind durch unterschiedlich schraffierte Kästchen dargestellt. Das Intron der prä-mRNA ist durch eine dünne Linie, die snRNAs sind durch dicke Linien dargestellt. BBP ist das Branchpoint-Binding Protein, A das Branchpoint-Adenosin. Die einzelnen Umlagerungen sind: a - Verdrängung der U1 snRNA aus der U1/5'-Spleißstellen-Helix durch die U6-snRNA; b - Bildung der U2/Branchsequenz-Helix unter Verdrängung des Bbp1p Proteins; c - Ersetzung einer intramolekularen U2-Helix durch eine andere; d - Auflösung der U4/U6 snRNA-Helix II und Bildung einer intramolekularen U6 snRNA-Helix; e - Auflösung der U4/U6 snRNA-Helix I sowie der U2 snRNA 5'-Haarnadelschleife, Bildung der U6/U2 snRNA-Helix I; f - Bildung der U6/U2 snRNA-Helix II. Die U5 snRNA ist hier zur Vereinfachung nicht gezeigt. Nach [3].

Das im Spleißosom ausgebildete RNA/RNA-Netzwerk ist also nicht nur sehr komplexer Natur, sondern es ist darüber hinaus auch noch äußerst dynamisch. Es ist nicht zu

erwarten, daß diese Dynamik der Umlagerungen von den RNAs selbst zustande gebracht wird. Außerdem sind die gebildeten RNA/RNA-Helices im Spleißosom sehr kurz, so daß es unwahrscheinlich erscheint, daß sich diese kurzen Bereiche der Komplementarität von selbst "finden", bzw. ausreichend stabile Wechselwirkungen miteinander eingehen können. Hier kommen die Funktionen der ca. 70-100 an der Spleißreaktion beteiligten Proteine zum tragen, die, wie man heute weiß, größtenteils Bestandteile der snRNPs sind. Sie katalysieren die Umlagerungen des RNA-Netzwerkes und kompensieren den Mangel an "Information" in den prä-mRNA-Introns. Die Aktivität von Proteinen ist auch die Ursache dafür, daß die prä-mRNA Spleißreaktion Energie in Form von ATP benötigt, obwohl die eigentlichen Transesterifizierungen ohne Energieverbrauch ablaufen können (siehe Gruppe II Introns). Die an der Spleißreaktion beteiligten Proteine lassen sich grob in zwei Klassen einteilen: 1. Proteine, die (unter bestimmten experimentellen Bedingungen) fest mit den UsnRNPs assoziiert sind. 2. Nicht-UsnRNP-Spleißfaktoren, die unabhängig mit dem Spleißsubstrat interagieren, bzw. nur im Laufe der Spleißreaktion - transient - mit den im Spleißosom enthaltenen snRNPs wechselwirken.

Im folgenden sollen nun zunächst die UsnRNPs und ihre Proteine beschrieben werden. Es werden Möglichkeiten zur Isolierung und Charakterisierung der UsnRNP-Proteine vorgestellt. Weiterhin werden Aufbau und Zusammensetzung der menschlichen UsnRNPs und, soweit zu Beginn dieser Arbeit bekannt, der UsnRNPs der Hefe beschrieben. Danach wird (exemplarisch) auf die verschiedenen Funktionen der UsnRNP-Proteine eingegangen, abschließend werden die Eigenschaften der am prä-mRNA Spleißen beteiligten nicht-UsnRNP-Proteine beschrieben.

2.4 UsnRNPs und ihre Proteine

2.4.1 Methoden zur Isolierung von UsnRNP-Proteinen

Die Isolierung von UsnRNPs ist der direkteste Weg, ihre Proteinkomponenten zu identifizieren. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Ansätze zur biochemischen Isolierung der menschlicher UsnRNPs und spleißosomaler Komplexe versucht. Anfangs wurden UsnRNPs allein durch die Kombination verschiedener (chromatographischer) Fraktionierungsmethoden aufgereinigt, wobei die Ausbeuten und die Reinheit der gewonnenen snRNP-Fractionen nicht vollends zufriedenstellend waren [31]. Zur Reinigung spleißosomaler Komplexe wurden Spleißextrakte mit einem künstlichen prä-mRNA-Substrat inkubiert. Die snRNP-Komplexe, die sich auf diesem Substrat bilden, wurden dann zunächst durch Gelfiltration voneinander getrennt. Anschließend wurden die Komplexe durch Affinitäts-Chromatographie mit immobilisierten Oligonukleotiden, die komplementär zu einer der

UsnRNAs sind, weiter gereinigt [32]. Diese Methode ist besonders geeignet, um auch die nicht-UsnRNP-Proteine zu identifizieren. Nachteile dieser Methode sind jedoch, daß man die snRNPs nur denaturierend von der Affinitätsmatrix eluieren kann und daß es nur bedingt möglich ist, bestimmte spleißosomale Komplexe in wohldefinierter Form zu reinigen, da diese Komplexe dynamischer Natur sind.

Die Nachteile der bislang beschriebenen Methoden - geringe Ausbeute und Reinheit, denaturierende Bedingungen und schlechte Definierbarkeit - ließen sich durch die Anwendung von Immunaффinitäts-Chromatographie überwinden. Als effizienteste Aufreinigungsmethode für native und funktionelle snRNPs erwies sich die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers, der die m₃G-Kappen-Struktur der snRNAs bindet (mAK H20; [33]). Die UsnRNPs können von diesem Antikörper durch freies m⁷G, mit dem der Antikörper kreuzreagiert, im nativen Zustand eluiert werden [34]. Durch verschiedene biochemische Methoden können dann einzelne UsnRNPs oder auch RNP-Subkomplexe aus der Gesamtmischung aller snRNPs isoliert, ihre Proteinkomponenten analysiert und ihre cDNAs kloniert werden.

In der Hefe erschien es lange Zeit aussichtslos, biochemische Methoden zur Isolierung und Identifizierung von snRNP-Proteinen anzuwenden, da die Hefe-Zelle ca. 500-1000-fach geringere Mengen an UsnRNPs enthält. Nur ca. 4% der Protein-kodierenden Hefe-Gene tragen Introns, so daß nur ein geringer Bedarf für Spleißaktivität besteht. Daher wurden hier überwiegend genetische Methoden eingesetzt, um spleißosomale Proteine zu identifizieren. So wurde z.B. nach Genen gesucht, deren Mutationen Spleißdefekte auslösen (pre-mRNA processing mutants – prp) [35-37]. Hefe-snRNP-Proteine wurden aber auch aufgrund ihrer Homologie zu bekannten menschlichen snRNP-Proteinen identifiziert (siehe z.B. [38]). Eine weitere Möglichkeit ist die Anwendung von breit angelegten Hefe-Two-Hybrid-Screens nach Proteinen, die mit bekannten Spleißfaktoren physisch interagieren können [39]. All diese Methoden sind jedoch indirekt und nicht erschöpfend, wenn es darum geht, alle Proteine eines bestimmten UsnRNPs zu identifizieren. So lassen sich mit den genetischen Screens zwar relativ sicher solche Proteine identifizieren, die zentrale Funktionen im Spleißosom übernehmen. Proteine jedoch, die zwar zur Effizienz der Spleißreaktion beitragen, aber nicht essentiell dafür sind, werden durch diese Methoden eher „übersehen“. Auch einige essentielle snRNP-Proteine wurden bislang nicht durch genetische Methoden entdeckt. Daher war es notwendig, auch in der Hefe biochemische Methoden zur Isolierung von snRNPs zu entwickeln.

2.4.2 Aufbau der snRNPs

Die biochemische Isolierung der menschlichen UsnRNPs ermöglichte eine detaillierte Analyse ihrer Proteinzusammensetzung und ihres strukturellen Aufbaus. Ein monomeres

UsnRNP besteht aus je einem snRNA-Molekül, an welches die Sm Proteine binden, die den U1, U2, U4 und U5 snRNPs gemeinsam sind. Die so gebildeten core snRNPs binden dann weitere, Partikel-spezifische Proteine, die nur in jeweils einem der snRNPs vorkommen. Darüberhinaus können die UsnRNPs auch noch Heteromere bilden, wie z.B. das U4/U6 di-snRNP und das [U4/U6.U5] tri-snRNP. Die UsnRNPs sind Partikel mit Sedimentationskoeffizienten von 12-25S und ihre Molekulargewichte bewegen sich zwischen 240 kDa und 1,8 MDa. Ihre Ausmaße - UsnRNPs haben Abmessungen von 8-30 nm - reichen daher aus, um ihre Struktur im Detail mit Hilfe der Elektronenmikroskopie studieren zu können. Der strukturelle Aufbau der UsnRNPs wird im folgenden anhand des U1 snRNPs erläutert.

Die Sm Proteine bilden mit der U1 snRNA das core U1 snRNP. Bei den Sm Proteinen handelt es sich um sieben kleine, basische Proteine (ein achttes Sm Protein, SmB' unterscheidet sich von SmB nur durch neun zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus), die zwei charakteristische Sequenzmotive (Sm Motive 1 und 2) enthalten. Die Sm Proteine bilden im Cytoplasma Heteromere aus, die mit der Sm-Bindungsstelle der snRNAs (Abb. 3 A) assoziieren [40]. Core snRNPs lassen sich biochemisch darstellen, z.B. durch Dissoziation der Partikel-spezifischen Proteine unter Hochsalz-Bedingungen oder durch Rekonstitution von snRNA-Transkripten mit isolierten snRNP-Proteinen. Die core-Partikel können durch Elektronenmikroskopie visualisiert werden (Abb. 5 A) - sie haben einen Durchmesser von ca. 8 nm und besitzen eine charakteristische, zentrale Vertiefung von ca. 2 nm Durchmesser.

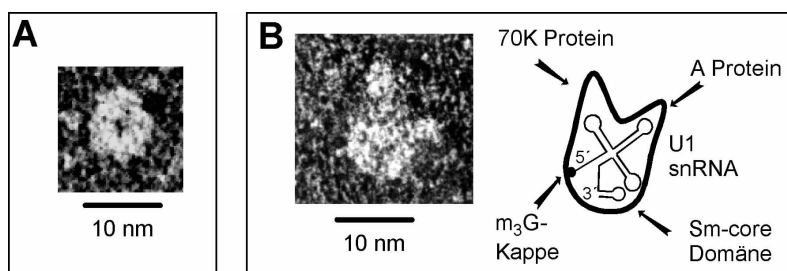


Abb. 5: Elektronenmikroskopische Bilder von menschlichen core U5 snRNPs und U1 snRNPs

Menschliche UsnRNPs können nach Negativfärbung mit Uranylformiat durch Transmissions-Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden. Die Balken entsprechen 10 nm.

A: Das core U5 snRNP, welches durch Ionenaustauscherchromatographie unter Hochsalzbedingungen aus U5 snRNPs gewonnen werden kann. **B:** Das U1 snRNP. Schematisch ist die Position der snRNA, der core Domäne und der Partikel-spezifischen Proteine A und 70K angegeben, wie sie durch Markierung mit spezifischen Antikörpern ermittelt werden konnte. Diese Abbildung wurde von Dr. Berthold Kastner zur Verfügung gestellt.

Kürzlich konnten Kristallstrukturen von zwei Heterodimeren der menschlichen SmB/D3 und SmD1/D2 Proteine gelöst werden [41]. Diese zeigen eine nahezu identische Interaktion der β -Faltblattstrukturen der Sm Motive, so daß eine Wechselwirkung aller sieben Sm Proteine in einer ringförmigen Struktur möglich erscheint (Abb. 6). In der Hefe wurden die Interaktionen der Sm Proteine untereinander durch Two-Hybrid-Experimente untersucht. Dabei zeigen sich wechselseitig hohe Affinitäten einzelner Sm Proteine mit jeweils zwei andere Proteinen [42, 43]. Dies steht in Einklang mit der vermuteten Ringstruktur des Sm

Protein-Komplexes und legt eine definierte Abfolge der Proteine nahe (siehe auch [41] und Abb. 6). Die Wechselwirkungen zwischen den Sm Proteinen D2 und F sowie D3 und G wurden beim Menschen auch durch Immunpräzipitation gezeigt [40].

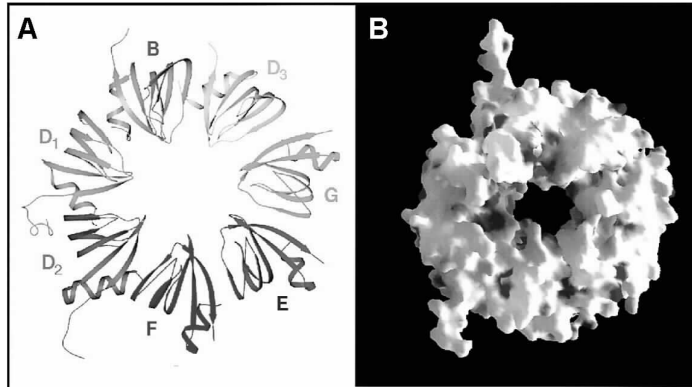


Abb. 6: Modell des snRNP Sm Protein-Heteromers

Die Kristallstrukturen der D1/D2 und B/D3 Dimere wurden gelöst [41]. A: Aufgrund der nahezu identischen Interaktion jeweils zweier Sm Proteine in den Dimerstrukturen, kann ein Modell erstellt werden, nachdem die sieben Sm Proteine ein ringförmiges Heptamer bilden. B: Van-der-Waals Oberflächenrepräsentation des Heptamer-Ringes. Dunkelgrau sind positiv geladene Bereiche der Proteinoberflächen, insbesondere auf der Ringinnenseite. Es wird daher vermutet, daß dort die UsnRNAs hindurch verlaufen könnten.

Nachdem die core snRNPs in den Zellkern transportiert wurden, binden sie die Partikel-spezifischen Proteine. Diese Proteine binden zum Teil Sequenz-spezifisch an die UsnRNAs. Dies ist beim U1 snRNP, das drei Partikel-spezifische Proteine besitzt, sehr gut untersucht. So binden die U1-70K und A Proteine mit ihren RNA-bindenden Domänen (RBDs) spezifisch die U1 snRNA-Haarnadelschleifen I und II [44, 45]. Die Protein/RNA-Wechselwirkungen eines Fragments des U1-A Proteins mit der U1 snRNA-Haarnadelschleife II konnten durch Aufklärung der Kristallstruktur des binären Komplexes im atomaren Detail analysiert werden [46]. Das U1-C Protein bindet dagegen durch Protein/Protein-Wechselwirkungen mit U1-70K und dem SmB-Protein an das U1 snRNP [47]. Die Bindung der U1 snRNP-spezifischen Proteine läßt sich sehr deutlich durch elektronenmikroskopische Untersuchungen veranschaulichen. Im Gegensatz zu den core-Partikeln sind im U1 snRNP zwei charakteristische Protuberanzen zu erkennen, die aus der core-Domäne gleichsam "heraus-schauen" (Abb. 5 B). Die beiden Proteine 70K und A konnten mit spezifischen Antikörpern in ebendiesen Protuberanzen lokalisiert werden.

Das hier beschriebene Strukturprinzip - snRNA, core Proteine, spezifische Proteine - ist allen snRNPs grundsätzlich gemeinsam. Im folgenden soll nun auf die Proteinkomposition der menschlichen UsnRNPs eingegangen werden.

2.4.2.1 Humane UsnRNP-Proteine

Die Proteine menschlicher, biochemisch isolierter snRNPs, sind in Tab. 2 aufgeführt.

Insgesamt wurden bislang sieben gemeinsame Sm Proteine (bzw. acht inkl. SmB) und 32 Partikel-spezifische Proteine identifiziert, die fest mit den menschlichen UsnRNPs assoziiert sind. Das Spleißosom besteht somit zu 80-90 % seiner Masse aus Proteinen. Die Klonierung der cDNAs dieser Proteine, sowie die anschließende Analyse ihrer Sequenzen,

	Human-Proteine	app. M _r [kDa]	12S U1	17S U2	14S U4/U6	20S U5	25S U4/U6.U5	Sequenzmotive	Referenz
gemeinsame Sm Proteine	Sm B	28	●	●	●	●	●	Sm Motive 1 und 2	zusammengefaßt in [48]
	Sm B'	29	●	●	●	●	●	Sm Motive 1 und 2	
	Sm D1	16	●	●	●	●	●	Sm Motive 1 und 2	
	Sm D2	16,5	●	●	●	●	●	Sm Motive 1 und 2	
	Sm D3	18	●	●	●	●	●	Sm Motive 1 und 2	
	Sm E	12	●	●	●	●	●	Sm Motive 1 und 2	
	Sm F	11	●	●	●	●	●	Sm Motive 1 und 2	
	Sm G	9	●	●	●	●	●	Sm Motive 1 und 2	
U1 snRNP-spezifisch	U1-C	22	●					Zink-Finger	[49]
	U1-A	34	●					2x RBD	[50]
	U1-70kD	70	●					RBD, SR	[51]
U2 snRNP-spezifisch	U2-A' U2-B"	31		●				leucinreich	[52]
		28,5		●				RBD	[53]
		15,6		●				-	
		33		●				-	
		35		●				-	[54]
		92		●				-	[54]
	SF3 A	SAP60		●				Zink-Finger	[55]
		SAP62		●				Zink-Finger, prolinreich	[56]
		SAP114		●				SURP	[57]
	SF3 B	SAP49		●				2x RBD	[58]
		SAP130		●				-	
		SAP145		●				-	[59]
		SAP155		●				-	[60]
U5 snRNP-spezifisch		220				●	●	-	[61, 62]
		200				●	●	2x DEXD/H	[63]
		116				●	●	G-Domäne, EF-2-ähn.	[38]
		110				●	●	-	
		102				●	●	TPR	[64]
		100				●	●	SR, DEXD/H	[65]
		65				●	●	-	[34]
		52				●	●	-	[64]
		40				●	●	WD-40	[66]
		27				●	●	SR	[67]
U4/U6 snRNP-spezifisch	SnuCyp-20	15				●	●	Thioredoxin-ähnlich	[68]
		90			●		●	-	[69]
		61			●		●	-	[34]
		60			●		●	WD-40	[69]
		20			●		●	Cyclophilin	[70, 71]
		15,5			●		●	RNA-bindend	[34, 72]

Tab. 2: Proteinkomponenten der humanen UsnRNPs

Die Präsenz der Proteine in den einzeln (z.B. durch Glyzeringradienten-Zentrifugation) darstellbaren menschlichen snRNP-Komplexen ist durch ausgefüllte Kreise markiert. Die snRNPs sind nach den enthaltenen snRNAs sowie ihrem Sedimentationskoeffizienten benannt. Die Präsenz des 27kD Proteins in 20S U5 snRNPs ist nur unter bestimmten Isolierungsbedingungen zu beobachten. Die benutzten Abkürzungen für die Sequenzmotive bedeuten: RBD=RNA-bindende Domäne; SR=Serin-Arginin-reiche Domäne (SR-Dipeptide); TPR=Tetratrico Peptide Repeat, ein Motiv, das Protein-Protein Wechselwirkungen vermittelt; SURP=SURP Motiv; DEXD/H=Konsensus-Domäne der ATP-abhängigen RNA-Helikasen; G-Domäne=GTP-bindendes und -hydrolysierendes Motiv; WD-40=Strukturmotiv der G β -Proteinfamilie.

zeigte eine überraschende Vielfalt an Sequenz-Motiven. Unter anderem lassen sich daraus für zahlreiche Proteine diverse katalytische Funktionen ableiten (auf die Funktionen der Proteine wird in Kapitel 2.4.3 näher eingegangen). Das Spleißosom hat somit einen gänzlich anderen Charakter als das Ribosom, das zu ca. 60 % aus RNA besteht und dessen zahlreiche Proteine fast nur RNA-bindende Strukturproteine darstellen.

Die Partikel-spezifischen Proteine verteilen sich wie folgt auf die einzelnen UsnRNPs:

Das **U1 snRNP** enthält drei spezifische Proteine (70K, A und C; s. Kapitel 2.4.2).

Das **U2 snRNP**, das je nach den verwendeten Bedingungen in verschiedenen Proteinzusammensetzungen isoliert werden kann, enthält in seiner 12S-Form nur 2 spezifische Proteine, A' und B". B" hat große Ähnlichkeiten mit U1-A und bindet die U2-Haarnadelschleife IV. Dazu benötigt es jedoch die Hilfe des U2-A' Proteins. Die Kristallstruktur des ternären Komplexes aus A'/B"/Loop IV konnte ebenfalls gelöst werden [73]. In seiner 17S-Form enthält das menschliche U2 snRNP 11 weitere Proteine. Sieben von diesen sind in einem Proteinheteromer, dem Spleißfaktor 3 (SF3) organisiert, der wiederum aus zwei Subkomplexen, SF3a und SF3b besteht. Diese Proteine wurden als Spleißosom-assoziierte Proteine (SAPs) bezeichnet, da sie nur sehr schwach mit dem U2 snRNP interagieren und ursprünglich nur als Bestandteile isolierter Spleißosomen nachgewiesen werden konnten.

Das **[U4/U6.U5] tri-snRNP** enthält insgesamt 16 Partikel-spezifische Proteine. Die strukturelle Organisation des tri-snRNPs ist im Detail nur unvollständig aufgeklärt. So ist z.B. kein spezifisches Protein bekannt, das eine typische RNA-Bindungs-Domäne enthält. Es ist daher nicht klar, wie diese spezifischen Proteine an das tri-snRNP binden. Einige Proteine stehen jedoch in direktem Kontakt mit der RNA [74]. Das tri-snRNP läßt sich durch Salzbehandlung in seine konstituierenden U4/U6 und U5 snRNPs zerlegen. Fünf der tri-snRNP-Proteine verbleiben beim U4/U6 snRNP, die restlichen elf Proteine binden weiterhin an das U5 snRNP (die Präsenz des 27 kDa Proteins mit dem U5 snRNP läßt sich nur unter bestimmten Bedingungen nachweisen). Durch Behandlung des tri-snRNPs mit chaotropen Salzen läßt sich ein stabiles, RNA-freies Protein-Heteromer, bestehend aus den 220, 200, 116 und 40 kDa Proteinen, darstellen [66].

Auch die menschlichen U2 snRNPs und [U4/U6.U5] tri-snRNPs wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Typische Ansichten dieser Partikel sind in Abb. 7 gezeigt; einzelne Proteine konnten in den Partikeln z.B. durch Immunkomplexbildung lokalisiert werden.

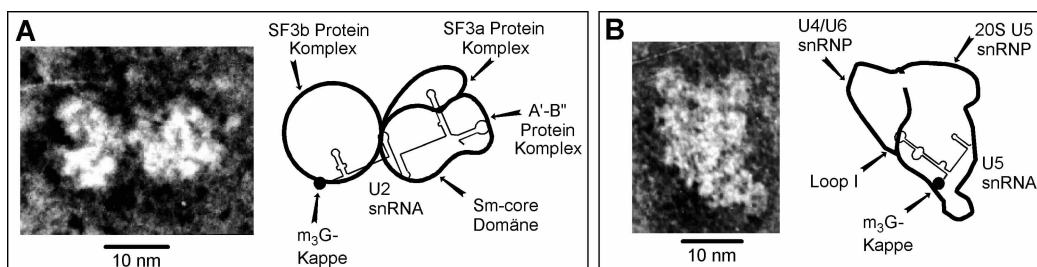


Abb. 7: Elektronenmikroskopische Bilder menschlicher U2 snRNPs und [U4/U6.U5] tri-snRNPs

Gezeigt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen mit Uranylformiat negativ gefärbter, biochemisch aufgereinigter, menschlicher UsnRNPs. Die Positionen einzelner Proteine wurden durch Untersuchung von Immunkomplexen der snRNPs mit spezifischen Antikörpern ermittelt. Die snRNAs sind durch dünne Linien dargestellt. **A:** 17S U2 snRNP; **B:** [U4/U6.U5] tri-snRNP. Diese Abbildung wurde von Dr. Berthold Kastner zur Verfügung gestellt.

2.4.2.2 UsnRNP-Proteine der Hefe

In der Hefe waren zu Beginn dieser Arbeit weit weniger UsnRNP-Proteine bekannt. Diese wurden entweder durch genetisches Screening ("Prp"), oder durch Datenbank-Suche nach Hefe-Homologen von menschlichen UsnRNP-Proteinen identifiziert (Tab. 3). Da die Spleißreaktion in ihren Grundzügen zwischen Mensch und Hefe gut konserviert ist, sollte es jedoch auch im Hefe-System noch eine ganze Reihe von weiteren UsnRNP-Proteinen geben.

	Hefe-Protein	ber. Mr [kDa]	U1	U2	U4/U6	U5	U4/U6.U5	Sequenzmotive	Referenz
gemeinsame Sm Proteine	SmD1	16,3	●	●	●	●	●	Sm Motive 1 und 2	[75]
	SmD3	11,2	●	●	●	●	●	Sm Motive 1 und 2	[76]
	SmE	10,4	●	●	●	●	●	Sm Motive 1 und 2	[77]
	SmF	9,6	●	●	●	●	●	Sm Motive 1 und 2	[78]
	SmG	8,5	●	●	●	●	●	Sm Motive 1 und 2	[78]
U6 snRNP-spezifisch	SmX4	10			●		●	Sm Motive 1 und 2	[78]
	Uss1p	21			●		●	Sm Motive 1 und 2	[79]
	Prp24p	51						3x RBD	[80]
U1 snRNP-spezifisch	Mud1p	34	●					2x RBD	[81]
	Snplp	34	●					RBD	[82]
	Prp39p	75	●					TPR-repeats	[83]
	Prp40p	69	●					2x WW	[84]
U2 snRNP-spezifisch	Yib9p	13		●				RBD	[85]
	Prp9p	63		●				Zink-Finger	[86]
	Prp11p	30		●				Zink-Finger, prolinreich	[87]
	Prp21p	33		●				SURP	[87, 88]
	Cus1p	50		●				-	[89]
U5 snRNP	Prp8p	280				●	●	-	[90]
U4/U6-spezifisch	Prp6p	104			●		●	TPR-repeats, Zink-Finger	[86]
	Prp4p	52			●		●	WD-40	[91, 92]
tri-snRNP-spezifisch	Brr2p	246					●	2x DEXD/H	[63, 93-95]
	Prp18p	25					●	-	[96]
	Prp38p	28					●	-	[97, 98]

Tab. 3: UsnRNP Proteine der Hefe, die zu Beginn dieser Arbeit bekannt waren

UsnRNP-Proteine der Hefe wurden überwiegend durch genetisches Screening nach Mutationen, die das prä-mRNA Spleißen inhibieren (Prp- pre-mRNA processing mutants), aber auch durch Sequenzvergleich mit bekannten menschlichen UsnRNP-Proteinen, identifiziert. Hier sind die Proteine aufgeführt, die zu Beginn dieser Arbeit bekannt waren. Die Zugehörigkeit der einzelnen Proteine zu einem bestimmten snRNP wurde durch Immunpräzipitationsexperimente nachgewiesen. Bezeichnung der Sequenzmotive: WW-Protein/Protein-Interaktions-Motiv; Rest siehe Tab. 2.

Die Assoziation dieser Proteine mit den einzelnen UsnRNPs wurde hier ausschließlich durch Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern ermittelt. Der Vergleich der Proteinzusammensetzungen der UsnRNPs in den beiden Spezies macht Ähnlichkeiten, aber auch einige interessante Unterschiede deutlich:

In der Hefe konnten nur fünf Sm Proteine identifiziert werden. In ihrer Assoziation mit den U1, U2, U4 und U5 snRNPs entsprachen diese den menschlichen Gegenstücken. Interessanterweise wurden aber auch zwei Sm-ähnliche Proteine identifiziert, die mit dem freien U6 snRNP assoziiert sind. U6 snRNP-spezifische Proteine waren beim Menschen gänzlich unbekannt. Immunpräzipitationsexperimente zeigten aber auch eine Präsenz dieser Proteine in U4/U6 snRNPs und [U4/U6.U5] tri-snRNPs. Diese Entdeckung legte die Vermutung nahe, daß auch das U6 snRNP mit Sm (-ähnlichen) Proteinen assoziiert sein

könnte. Es wurde noch ein weiteres Hefe-U6 snRNP-Protein gefunden: Prp24p ist nur mit einem freien U6 snRNP assoziiert, im Gegensatz zu den Sm-ähnlichen Proteinen.

Insgesamt konnten in der Hefe vier U1 snRNP-spezifische Proteine identifiziert werden. Zwei von diesen, Snp1p und Mud1p, entsprachen den humanen U1-70K und A Proteinen. Die anderen zwei Proteine, Prp39p und Prp40p, haben keine bekannten Orthologen im menschlichen U1 snRNP. Hier könnten sich die evolutionären Unterschiede bei der Erkennung der 5'-Spleißstellen in einer unterschiedliche Proteinausstattung der an diesem Prozeß beteiligten U1 snRNPs widerspiegeln.

Beim Hefe-U2 snRNP konnten nur fünf Proteine identifiziert werden. Von diesen entspricht eines dem U2-B'' Protein (Yib9p), drei Proteine entsprechen den menschlichen SF3a-Untereinheiten (Prp9p, Prp11p und Prp21p), das letzte Protein (Cus1p) ist das Orthologe der SF3b-Untereinheit SAP145.

Sechs der identifizierten Proteine konnten dem tri-snRNP zugeordnet werden. Von diesen haben nur vier (Prp8p, Snu246p, Prp6p und Prp4p) Gegenstücke im menschlichen tri-snRNP (die 220, 200, 102 und 60 kDa Proteine). Ein weiterer Unterschied ist die offensichtlich andere strukturelle Organisation des Hefe-tri-snRNPs: Während die humanen 200 und 102 kDa Proteine mit dem freien U5 snRNP assoziiert bleiben, dissoziiert das Hefe-Protein Snu246p (genauso wie Prp18p und Prp38p) bei erhöhter Salzkonzentration von allen snRNPs ab, Prp6p bleibt dagegen mit dem U4/U6 snRNP assoziiert. Desweiteren wurde ein Hefe-Ortholog des humanen 100 kDa Proteins identifiziert, Prp28p, jedoch ist dieses nicht mit einem snRNP assoziiert.

In den vergangenen drei Jahren sind noch einige weitere Hefe-UsnRNP-Proteine durch genetische Methoden oder Homologievergleich identifiziert wurden: So wurden mit Lea1p, Hsh49p und ySAP155 [60, 99, 100] drei U2 snRNP Proteine gefunden (entsprechen den humanen U2-A', SAP49 und SAP155 Proteinen). Drei inzwischen identifizierte tri-snRNP Proteine sind Snu114p [38], Prp3p [101] und Prp31p [102] (entsprechen den menschlichen 116, 90 und 61 kDa Proteinen) und es wurde ein weiteres U6-spezifisches Sm-ähnliches Proteine, Lsm8p gefunden [103]. Die Tatsache, daß in der langen Zeit der Spleißosomforschung in der Hefe nur relativ wenig snRNP-Proteine gefunden wurden, zeigt, daß die genetischen Methoden nicht erschöpfend sind, um alle Proteine eines bestimmten snRNPs zu identifizieren. Methoden zur biochemischen Isolierung der Hefe-UsnRNPs sollten dagegen schnell und umfassend die Aufklärung der Proteinzusammensetzung der Hefe-UsnRNPs ermöglichen, sowie weitere Unterschiede und Ähnlichkeiten in ihrer strukturellen Organisation im Vergleich zu den humanen Gegenständen aufzeigen.

2.4.3 Funktionen der UsnRNP-Proteine beim prä-mRNA Spleißen

Die in Kapitel 2.4.2 aufgelisteten Proteine und ihre Vielfalt an unterschiedlichen Motiven und Domänen lassen auf eine ebenso große Vielfalt an verschiedenen Funktionen schließen, die von den spleißosomalen Proteinen erfüllt werden. Von diesen sollen hier jedoch nur einige exemplarisch besprochen werden:

RNA-bindende Proteine: Die UsnRNPs enthalten zahlreiche RNA-bindende Proteine. Diese enthalten Sequenz-Motive, die mit RNA wechselwirken können, z.B. RNA-Bindungs-Domänen (RBDs), aber auch Zinkfinger-Motive. Beispiele für RBD-Proteine sind die bereits genannten U1 und U2 snRNP-spezifischen Proteine U1-A, U1-70k und U2-B", die spezifisch an RNA-Haarnadelschleifen der U1 und U2 snRNAs binden.

Ein Beispiel für Zinkfingerproteine ist das U1-C Protein, dessen Zinkfingerdomäne notwendig für seine Bindung an das U1 snRNP ist. Ob U1-C mit dieser Domäne direkt die U1 snRNA kontaktiert, ist allerdings unklar [47, 104].

RNA-paarende Proteine: RNA-bindende Proteine können auch andere Funktionen übernehmen, als nur RNA zu binden. So unterstützt das Hefe-Protein Prp24p mit Hilfe seiner drei RBDs die Basenpaarung der U6 und U4 snRNA [19, 80]. Bestimmte Mutationen der U6 snRNA, die die U4/U6 snRNA-Duplex destabilisieren, führen zur Akkumulation eines U4/U6-Prp24p-Komplexes, der normalerweise nur als kurzlebiges Intermediat der U4/U6 Bildung vorkommt [105].

Protein/Protein-Wechselwirkungen im Spleißosom: Zahlreiche UsnRNP-Proteine enthalten Motive, die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen vermitteln können. Beispiele hierfür sind die sogenannten tetratricopeptide-repeats (TPR-Motive): Dieses Motiv besteht aus ca. 34 Aminosäuren, die zwei amphipathische α -Helices ausbilden. Die Kristallstruktur eines Fragmentes der menschlichen Protein-Phosphatase PP5 zeigt, daß mehrere solcher TPRs eine Art von "Superhelix" ausbilden, in deren Furche Peptidketten gebunden werden könnten [106]. Ein Hefe-spezifisches U1 snRNP Protein, Prp39p, sowie das Protein Prp6p (Ortholog des menschlichen U5-102kD Proteins) enthalten zahlreiche TPR-Motive [83, 86]. Bindungspartner dieser Proteine sind jedoch noch nicht ermittelt worden. Desweiteren finden sich UsnRNP-Proteine, welche WD-Motive enthalten. Dies sind also Konsensusmotive der β -Untereinheiten der trimeren G-Proteine, die ebenfalls Protein/Protein-Wechselwirkungen vermitteln. Dazu gehören das menschliche U5-40kD Protein sowie das Protein hPrp4 (Prp4p in der Hefe) [66, 69, 91, 92]. Ein weiteres Protein/Protein-Interaktionsmodul ist die sogenannte WW-Domäne, die spezifisch Prolin-reiche Sequenzen bindet. Solche Domänen finden sich im Hefe-U1 snRNP-Protein Prp40p (siehe Kapitel 2.5).

Unter den UsnRNP-Proteinen finden sich noch andere Proteine, deren Sequenzmotive bestimmte Funktionen vermuten lassen. So ähnelt das menschliche U5-116kDa Protein (in der Hefe Snu114p) der ribosomalen Translokase EF-2, einem potentiellen Motorprotein mit GTPase-Aktivität [38]. U5-116kD könnte möglicherweise unter GTP-Verbrauch eine Motorprotein-Funktion im Spleißosom ausüben, z.B. wenn das Spleißosom in einem prozessiven Vorgang das Intron nach der korrekten 3'-Spleißstelle "absuchen" würde [38]. Im menschlichen tri-snRNP findet sich außerdem ein sogenanntes Cyclophilin (SnuCyp20), das cis/trans-Isomerisierungen des Peptidrückgrates katalysieren kann [70, 71].

2.5 Nicht-UsnRNP-Proteinspleißfaktoren

Um ein funktionelles Spleißosom zu bilden sind nicht nur die UsnRNPs, sondern auch zahlreiche Proteinspleißfaktoren nötig, die nicht mit UsnRNPs assoziiert sind. Diese agieren zu bestimmten Zeitpunkten während der Spleißreaktion, z.B. bei der Erkennung der Spleißstellen oder der Katalyse der spleißosomalen Konformationsänderungen, aber auch unabhängig von spleißosomalen Vorgängen.

Eine wichtige Gruppe von nicht-snRNP Faktoren sind Proteine der DEXD/H-Familie der ATP-abhängigen **RNA-Helikasen** [107]. Diese Proteine können unter ATP-Verbrauch RNA-Helices entwinden und besitzen mehrere Konsensus-Motive, z.B. zur ATP-Bindung, die charakteristisch für diese Proteinfamilie sind. DEXD/H-Proteine finden sich in allen zellulären Prozessen, die Konformationsänderungen von RNA beinhalten, so z.B. bei der Translation (Elongationsfaktor eIF4A, der Prototyp dieser Proteinfamilie). Die im prä-mRNA Spleißen involvierten Helikasen sind zuerst in der Hefe entdeckt und charakterisiert worden. Die Entdeckung dieser Proteine durch genetische Methoden spiegelt wider, daß diese Proteine essentielle Funktionen im Spleißprozeß ausüben. In der Hefe umfaßt diese Gruppe die Proteine Prp5p, Prp28p, Prp2p, Prp16p, Prp22p und Prp43p (in der Reihenfolge, in der sie während des Spleißzyklus benötigt werden; vgl. Abb. 2). Im Spleißprozeß üben die RNA-Helikasen wichtige Funktionen bei den zahlreichen Umlagerungen des RNA-Netzwerks aus (Abb. 4). So muß z.B. für die Bindung des U2 snRNPs an die prä-mRNA die Struktur der U2 snRNA durch Auflösung einer intramolekularen Helix und Bildung einer anderen verändert werden. Dieser Schritt wird wahrscheinlich durch die RNA-Helikase Prp5p katalysiert [108].

Weitere RNA-Umlagerungen beim Aufbau und der Aktivierung des Spleißosoms beinhalten die Auflösung der Basenpaarung der U1 snRNA mit der 5'-Spleißstelle (vermutlich durch Prp28p ermöglicht [109]). Die Auflösung der U4/U6 Duplex wird durch die Helikase Brr2p katalysiert, die, im Gegensatz zu den anderen Helikasen, mit dem tri-snRNP assoziiert ist [110]. Um den ersten katalytischen Schritt der Spleißreaktion zu ermöglichen, ist die Aktivität der RNA-Helikase Prp2p nötig [111], der zweite Schritt der Spleißreaktion kann

durch Mutationen in der RNA-Helikase Prp16p blockiert werden [112]. Nachdem die beiden Reaktionen katalysiert wurden, kommt es zur Freisetzung der Spleißprodukte (ligierte mRNA und verzweigtes Intron; Abb. 2), sowie der UsnRNPs aus dem postspleißosomalen Komplex. Auch hierbei sind RNA-Helikasen beteiligt: Prp22p [113, 114] und Prp43p [115].

Inzwischen wurden auch mehrere Vertebraten-Orthologe der RNA-Helikasen identifiziert: U5-100kD sowie U5-200kD, die Orthologen von Prp28p und Brr2p, sind beim Menschen beide mit dem tri-snRNP assoziiert [63, 65]. Weitere Helikasen bei Vertebraten sind hPrp16p, HRH1 (das Ortholog von Prp22p) und mDEAH9 (entspricht Prp43p). Die Funktionen, die die Helikasen beim Spleißen ausüben sind also im wesentlichen evolutionär konserviert.

Die zweite wichtige Gruppe von nicht-snRNP-Spleißfaktoren sind die sogenannten **SR-Proteine**. Diese Proteine zeichnen sich durch eine charakteristische Domäne aus, die extensive Wiederholungen von Serin/Arginin (SR)-Dipeptiden enthalten. Oft enthalten SR-Proteine auch noch RNA-Bindungs-Domänen. Diese Proteine können mit ihren SR-Domänen untereinander Protein/Protein-Wechselwirkungen eingehen, die SR-Domänen können aber auch mit RNA wechselwirken (siehe z.B. [116]). SR-Proteine übernehmen beim konstitutiven Spleißen wichtige Aufgaben bei der Erkennung der Spleißstellen und somit bei der Bildung der frühen Spleißkomplexe sowie des Prä-Spleißosoms. So stabilisieren sie z.B. die Bindung des U1 snRNPs an die prä-mRNA (Abb. 8 A). SR-Proteine sind außerdem wichtig beim Prozeß des alternativen Spleißens. Hierbei wird z.B. ein 3'-Exon mit verschiedenen stromaufwärts gelegenen 5'-Exons kombiniert, so daß bestimmte Exons entweder zusammen mit den flankierenden Introns aus der prä-mRNA herausgeschnitten werden oder alternativ mit ins Spleißprodukt "übernommen" werden. Es kann auch innerhalb eines Exons mehrere 5'-Spleißstellen geben. Die "kryptischen" 5'-Spleißstellen, die stromaufwärts des eigentlichen Exon-Intron-Übergangs (also innerhalb des Exons) liegen, beinhalten oft "Verstärker"-Sequenzen, die in regulierter Weise, z.B. Gewebe-spezifisch, von SR-Proteinen gebunden werden. Die SR-Proteine leiten dann das U1 snRNP zu diesen 5'-Spleißstellen hin. Die Aktivität der SR-Proteine wird durch Phosphorylierung der Serine in den SR-Domänen reguliert [117].

Interessanterweise gibt es in der Hefe keine Spleißfaktoren mit SR-Domänen. Die Funktionen der SR-Proteine müssen in der Hefe also von anderen Proteinen übernommen werden. Dies läßt sich gut am Beispiel der Protein-Interaktionen im ersten spleißosomalen Komplex, dem E- oder Commitment-Komplex verdeutlichen (Abb. 8 A und B).

In diesem Komplex bindet das U1 snRNP an die 5'-Spleißstelle. Zusätzlich kommt es aber durch eine indirekte, Protein/Protein-vermittelte Wechselwirkung des U1 snRNPs mit der 3'-Spleißstellen-Region zu einer Verbückung des Introns, so daß die 5'- und 3'-Spleißstellen in räumliche Nähe zueinander gebracht sind. Diese Wechselwirkung wird in

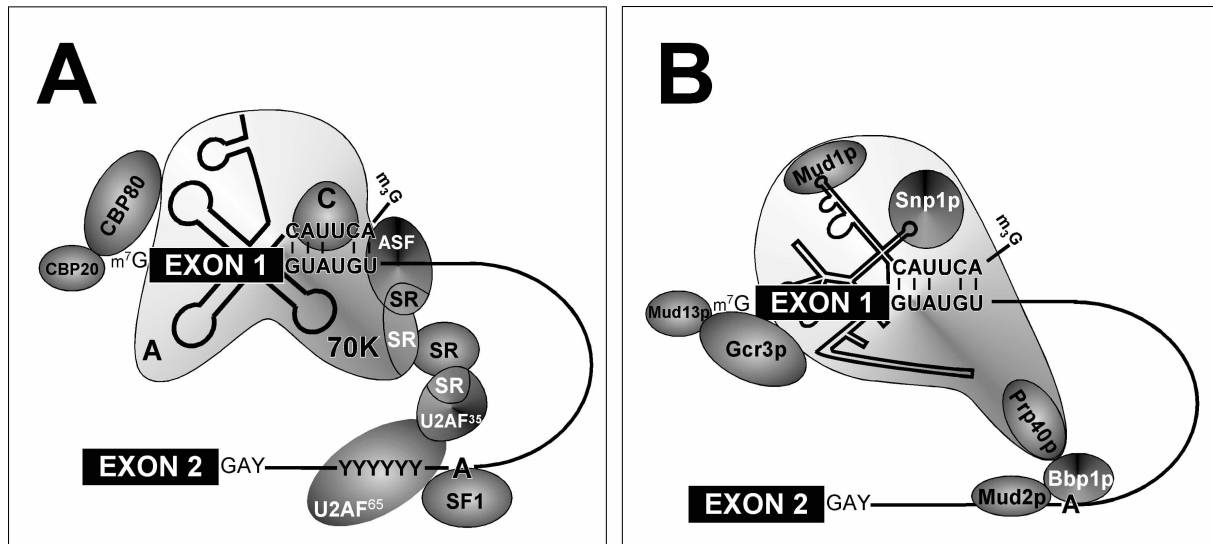


Abb. 8: Bildung der frühen Spleißkomplexe beim Menschen und in der Hefe

A: E-Komplex beim Menschen. Das U1 snRNP bindet durch Basenpaarung der U1 snRNA mit der 5'-Spleißstelle an die prä-mRNA (durch ausgeschriebene Sequenzen verdeutlicht). Die U1 snRNA ist durch eine dicke Linie in ihrer Sekundärstruktur schematisch dargestellt. Die Verzweigungs-Sequenz ist durch ein A angedeutet. m⁷G: Trimethylguanosin-Kappe der U1 snRNA; m⁷G: Kappenstruktur der prä-mRNA, die durch die beiden Untereinheiten des Cap-Binding Complex (CBC20 und CBC80; in der Hefe Mud13p und Gcr3p) gebunden wird. Durch Protein/Protein-Wechselwirkungen, die über SR-Proteine vermittelt sind (SR deutet die SR-Domänen der verschiedenen Proteine an), kommt es zu einer Verbrückung des Introns und einem indirekten Kontakt des U1 snRNPs mit der 3'-Spleißstellen-Region. Die beiden Spleißstellen werden so bereits in diesem frühen Stadium der Spleißosomassemblierung in räumliche Nähe zueinander gebracht. Die Wechselwirkung zwischen U1-70K und U2AF³⁵ wird vermutlich durch SC-35 vermittelt. U2AF⁶⁵ bindet die Polypyrimidin-Region der humanen Introns (YYYYYY). Das U1-C Protein stabilisiert die Basenpaarung der U1 snRNA mit der 5'-Spleißstelle und der Spleißfaktor SF1 bindet an die Verzweigungssequenz. **B:** Die Bildung des Commitment-Komplexes (CC2) in der Hefe führt ebenfalls zu einer Verbrückung des Introns und einer indirekten Wechselwirkung des U1 snRNPs, das an der 5'-Spleißstelle gebunden ist, mit der 3'-Spleißstellen-Region. Hier sind, anstelle von SR-Proteinen, das U1 snRNP-spezifische Protein Prp40p und das Branchpoint-bindende Protein (Bbp1p) beteiligt. Mud2p, das Ähnlichkeiten mit U2AF⁶⁵ aufweist, geht eine Wechselwirkung mit Bbp1p ein und bindet die Region stromabwärts der Verzweigungssequenz. Die Positionierung der Hefe-U1 snRNA und der Proteine ist willkürlich. Nach [118, 119].

Vertebraten durch SR-Proteine vermittelt. Ein Dimer zweier SR-Proteine, der U2-auxiliary-factor U2AF [120] bindet mit seiner 65kDa-Untereinheit an die Pyrimidin-reiche Region stromabwärts der Verzweigungssequenz [116]. Über die SR-Domäne der 35 kDa-Untereinheit von U2AF und das SR-Protein SC-35 wird das U1 snRNP-Protein U1-70K kontaktiert, das ebenfalls eine SR-Domäne enthält. (Abb. 8 A). In der Hefe kommt es im entsprechenden Commitment-Komplex ebenfalls zu einer Verbrückung des Introns. Hier ist jedoch nicht das U1-70K-Ortholog, Snp1p, involviert, das auch keine SR-Domäne besitzt, sondern das Hefe-spezifische U1 snRNP-Protein Prp40p. Dieses kontaktiert mit Hilfe seiner WW-Domänen spezifisch Polyprolin-Sequenzen in dem Protein Bbp1p, das an die Verzweigungs-Sequenz bindet [118, 121]. Bbp1p kontaktiert außerdem das Protein Mud2p, das die Region stromabwärts der Verzweigungssequenz bindet und Ähnlichkeiten mit U2AF⁶⁵ hat, jedoch keine SR-Domäne enthält [122]. In der Hefe können also funktionell analoge Wechselwirkungen im menschlichen E-Komplex durch ganz andere Proteine vermittelt werden, die keine SR-Domänen enthalten. Um dies genauer aufzuklären, wäre die Isolierung des gesamten U1 snRNPs der Hefe ein wichtiger Schritt. Nicht zuletzt deshalb sollten in dieser

Arbeit Methoden zur biochemischen Isolierung eines einzelnen UsnRNPs der Hefe entwickelt werden, wie nun abschließend erläutert werden soll.

2.6 Konzeption und Aufgabenstellung

Im Humansystem können UsnRNPs und ihrer Proteine mit verschiedenen biochemischen Ansätzen charakterisiert werden, was zu einer detaillierten Aufklärung der Proteinzusammensetzung und strukturellen Organisation der menschlichen UsnRNPs geführt hat. Wenn es jedoch darum geht, funktionelle Zusammenhänge zwischen einzelnen UsnRNP-Proteinen und/oder snRNAs im Spleißosom zu ermitteln, gelangt man mit biochemischen Methoden schnell an die Grenzen des Möglichen. Dies hängt mit dem komplexen Aufbau der UsnRNPs zusammen: Es handelt sich um große, multifaktorielle Ribonukleoproteinkomplexe, die biochemisch im wesentlichen nur als vollständige Partikel studiert werden können.

Möchte man jedoch die Funktionen eines einzelnen Proteins, einer snRNA oder auch bestimmter Bereiche dieser snRNA ermitteln, so bietet die Anwendung genetischer Methoden viel bessere Möglichkeiten. So kann man z.B. gezielt Mutationen in den entsprechenden Genen einführen. Diese Methoden erlauben es, die Funktion spleißosomaler Komponenten in der *in vivo*-Situation zu untersuchen. Anders als bei biochemischen Untersuchungen *in vitro* kann man hier die störenden Einflüsse künstlicher experimenteller Bedingungen ausschließen und erhält so Ergebnisse, die die reale Situation in der Zelle widerspiegeln. Die Anwendung genetischer Methoden ist jedoch beim Menschen kaum möglich, weshalb hier die Hefe als Modellorganismus verwendet wird. Um jedoch die UsnRNP-Proteine zu identifizieren, sind die genetischen Methoden nur unzureichend geeignet, da sich mit ihnen immer nur einzelne Proteine identifizieren lassen. Will man alle Proteine ermitteln, die zu einem bestimmten snRNP-Partikel gehören, so ist die biochemische Isolierung dieses Partikels der beste und schnellste Weg. In der Hefe kommen snRNPs aber nur in sehr geringen Mengen vor, so daß hier gut 10 Jahre lang kein Versuch unternommen wurde, diese Partikel biochemisch zu reinigen. Die Entwicklung biochemischer Methoden in der Hefe würde die optimale Situation schaffen, in einem Organismus beide Herangehensweisen (Biochemie und Genetik) zum Studium der snRNP-Protein-Funktionen zu kombinieren.

Wie aus Tab. 3 deutlich wird, waren zu Beginn dieser Arbeit deutlich weniger UsnRNP-Proteine der Hefe bekannt, als beim Menschen. Die Identifizierung möglichst aller Proteine der Hefe-UsnRNPs sollte daher ein vorrangiges Ziel dieser Arbeit sein, um dann später diese Proteine mit genetischen Methoden studieren zu können. Selbst das anfänglich nur unzureichende Wissen über die UsnRNPs der Hefe machte deutlich, daß es Unterschiede, aber auch Ähnlichkeiten zwischen Mensch und Hefe gibt (insbesondere bei den frühen Schritten; Abb. 8). Dagegen scheinen die späteren Vorgänge im Spleißosom, die auch die

eigentliche Katalyse einschließen, in beiden Spezies recht ähnlich. Die Identifizierung aller Hefe-snRNP-Proteine sollte hier einen noch umfassenderen Vergleich erlauben.

Vor einiger Zeit wurde in unserem Labor versucht, die snRNPs der Hefe biochemisch mit Hilfe der H20-Chromatographie aufzureinigen, was sich schließlich bewerkstelligen ließ [123]. Die UsnRNPs der Hefe wurden als Mischung mit den ebenfalls eine m₃G-Kappe tragenden snoRNPs (nukleoläre snRNPs, die an der Prozessierung der ribosomalen Vorläufer-RNA beteiligt sind) in Mengen aufgereinigt, die zur Charakterisierung der koisolierten Proteine durch SDS-PAGE und Silberfärbung ausreichten. Durch Glyzeringradienten-Zentrifugation wurden die Partikel partiell voneinander getrennt, so daß sich erste Aufschlüsse über die Zusammensetzung der Hefe-UsnRNPs gewinnen ließen. So wurde hier schnell deutlich, daß das U1 snRNP vermutlich viel mehr Proteine enthält als sein humanes Gegenstück. Die Reinheit dieser snRNPs genügte aber noch nicht, um mit einer Identifizierung der Proteine zu beginnen. Die isolierbaren Mengen würden eine Sequenzierung ohnehin nur dann ermöglichen, wenn empfindlichere Methoden als z.B. Edman-Abbau zur Peptidsequenzierung verwendet werden könnten. In den letzten Jahren wurden aber sehr fortgeschrittene Methoden zur massenspektrometrischen Peptidsequenzierung entwickelt, die die benötigten Proteinmengen drastisch reduzierten [124, 125]. Wenn darüber hinaus das Genom des studierten Organismus bekannt wäre, so würde sich jedes identifizierte Peptid innerhalb kürzester Zeit einem bestimmten Gen dieses Organismus zuordnen lassen. Hier bietet sich die Hefe idealerweise als Studienobjekt an, da die Sequenzierung ihres Genoms - als erstes Genom eines Eukaryonten - 1997 abgeschlossen wurde [126]. Die Anwendung dieser Methoden sollte eine schnelle Identifizierung der UsnRNP-Proteine der Hefe ermöglichen.

Zunächst sollte die spezifische Isolierung eines bestimmten snRNPs erreicht werden. Dazu konnte der biochemische Ansatz durch die Anwendung der Genetik gut ergänzt werden: Das Gen eines bestimmten snRNP-spezifischen Proteins läßt sich so verändern, daß das Protein konstitutiv mit einem zusätzlichen, Affinität vermittelnden Peptid exprimiert wird. Das entsprechende UsnRNP sollte sich dann aus der Mischung der Gesamt-snRNPs durch Affinitätschromatographie in nativem Zustand isolieren lassen. Dies gelang zunächst für das U1 snRNP. Dazu wurde ein Stamm verwendet, der das U1-spezifische Protein Snp1p mit einem Hexahistidin-Peptid exprimiert. Das U1 snRNP ließ sich dann durch Ni-NTA-Chromatographie aus der Mischung aller snRNPs isolieren.

Die Methoden zur biochemischen Isolierung von UsnRNPs der Hefe, wie sie beim U1 snRNP erfolgreich eingesetzt werden konnten, sollten nun auch auf die übrigen Hefe-snRNPs angewendet werden. Neu identifizierte Proteine unbekannter Funktion sollten dann mit Hilfe genetischer Methoden (z.B. Gen-Deletion oder induzierte Depletion eines bestimmten snRNP-Proteins *in vivo*) und biochemischer Methoden (z.B. Nachweis dieser Proteine als Teil bestimmter spleißosomaler Komplexe) funktionell charakterisiert werden. Dies sollte zum

Verständnis ihrer Beteiligung am Spleißprozeß beitragen. Die strukturelle Organisation der UsnRNPs der Hefe sollte biochemisch untersucht werden (z.B. durch spezifische Immunpräzipitation oder Behandlung des gesamten UsnRNPs mit hohen Salzkonzentrationen - womöglich können so stabile Subkomplexe von snRNP-Proteinen identifiziert werden). Ein weiteres Ziel war das Studium der makromolekularen Struktur der UsnRNPs der Hefe durch Elektronenmikroskopie und deren Vergleich mit der Ultrastruktur der menschlichen snRNPs.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien, Medien, Chromatographiematerialien

Acrylamid	Sigma, Deisenhofen	Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Agarose (Typ II)	Sigma, Deisenhofen	Kaliumphosphat	Sigma, Deisenhofen
Agarose für Komplexegele	Roth, Karlsruhe	L-Aminosäuren	USB, Cleveland, Ohio
Bacto-Agar	Difco Laboratories, USA	N,N'-Methylen-bis-Acrylamid	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Pepton	Difco Laboratories, USA	Natriumacetat	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, USA	Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Bio-Rad, München	Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blau		Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
-G250 (Proteinbestimmung)	Serva, Heidelberg	Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
-R250 (Färbung von SDS-Gelen)	Serva, Heidelberg	Phenol	Roth, Karlsruhe
-G-Kolloidal Konzentrat	Sigma, Deisenhofen	Phenylmethylsulfonylfluorid	Boehringer, Mannheim
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen	Protein A Sepharose	Amersham Pharmacia
N,N,N',N'-Ethylendiamin-tetraacetat	Roth, Karlsruhe	Polyethylenglycol	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim	Polyvinylpyrrolidon	Sigma, Deisenhofen
Ficoll	Pharmacia, Schweden	Ponceau S	Serva, Heidelberg
Glutardialdehyd	Sigma, Deisenhofen	Protein A-Sepharose CL-4B	Pharmacia, Freiburg
Glutathion, reduziert	Boehringer, Mannheim	Rabbit IgG Agarose	Sigma, Deisenhofen
Glutathion-Sepharose	Amersham Pharmacia	Rinderserumalbumin	Boehringer, Mannheim
Glyzin	Roth, Karlsruhe	Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Guanidin-Hydrochlorid	Fluka, Schweiz	D-Sorbitol	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Roth, Karlsruhe	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Sigma, Deisenhofen
Hefe-Extrakt	Difco Laboratories, USA	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	Roth, Karlsruhe
Hepes	Calbiochem, USA	Tween-20	USB, Cleveland
Imidazol	Boehringer, Mannheim	Xylencyanol FF	Fluka, Schweiz
Isopropyl-Thiogalaktosid (IPTG)	Boehringer, Mannheim	Yeast Nitrogen Base w/o aminoacids	Difco Laboratories, USA
Kalbsthymus-DNA	Sigma, Deisenhofen		

Alle weiteren eingesetzten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

3.1.2 Organismen

3.1.2.1 Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

STAMM	GENOTYP	KURZBESCHREIBUNG	REFERENZ
BJ2168	<i>MATa, leu2, trp1, ura3, prb1-1122, pep4-3, prc1-407, gal2</i>	Haploider Stamm mit Deletionen verschiedener Proteasegene.	
YPH499	<i>MATa ura3-52, trp1-Δ63, his3-Δ200, lys2-801, ade2-101, leu2-Δ1</i>	Haploider Stamm mit restloser Deletion des <i>HIS3</i> Lokus	[127]
TR1 a/α (YPF1)	<i>MATa/MATα, trp1-Δ/trp1-Δ, his3-Δ/his3-Δ, ura3-52/ura3-52, lys2-801/lys2-801, ade2-101/ade2-101</i>	Diploider Stamm, exprimiert Proteasen	[127]
TR2 a	<i>MATa, trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101</i>	Haploides <i>MATa</i> Isolat aus TR1 a/α	[127]
BSY283	<i>MATa, ade2, arg4, leu2-3,112, trp1-289, ura3-52, snp1::LEU2; pBS357 (SNP1-6xHis N-ter.; CEN, TRP1)</i>	Haploid, <i>SNP1</i> auf Chromosom deletiert; trägt Plasmid pBS357: <i>SNP1</i> mit N-terminalem 6xHis-Tag	Dr. Bertrand Séraphin, EMBL Heidelberg
W303-Prp4-8xHis	<i>Mata(?), trp1, ade2, ura3, prp4Δ::HIS3; pyCp-Prp4-His (ARS/CEN/LEU2; PRP4-8xHis Cterm)</i>	Hervorgegangen aus W303-1A, R. Rothstein; chromos. Kopie von PRP4 zerstört, trägt yCp-Prp4-His (PRP4 mit C-term. 8xHis Tag).	[128, 129]
YPF24	<i>MATa, trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101, snu114Δ::HIS3; pRS314/114-WT-6xHis NTerm IOPN</i>	Wie TR2 a, jedoch Deletion von SNU114 und Plasmid mit SNU114-6xHis Tag N-Term.	Dr. P. Fabrizio
AGY1	<i>MATa, ade2, arg4, leu2-3,112, trp1-289, ura3-52, snp1::LEU2, nam8Δ::URA3; pBS357 (SNP1-6xHis N-ter.; CEN, TRP1)</i>	wie BSY283, aber zusätzlich ist hier <i>NAM8</i> durch Insertion von <i>URA3</i> deletiert	Diese Studie
AGY2	<i>MATa/MATα, trp1-Δ/trp1-Δ, his3-Δ/his3-Δ, ura3-52/ura3-52, lys2-801/lys2-801, ade2-101/ade2-101, SNU71/snu71::URA3</i>	hervorgegangen aus TR1a/α, eine Kopie von <i>SNU71</i> ist deletiert durch Insertion von <i>URA3</i>	Diese Studie

AGY3	<i>MATa/MATα, trp1-Δ/trp1-Δ, his3-Δ/his3-Δ, ura3-52/ura3-52, lys2-801/lys2-801, ade2-101/ade2-101, SNU71/snu71::URA3; pRS314-SNU71 (ARS/CEN/TRP1)</i>	wie AGY2, aber trägt zusätzlich das <i>TRP1</i> -Plasmid pRS314 mit einer Wildtyp-Kopie von <i>SNU71</i>	Diese Studie
AGY4	<i>MATa(?), trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101, snu71::URA3; plasmid pRS314-SNU71 (ARS/CEN/TRP1)</i>	Haploides Isolat aus AGY3 mit Deletion <i>snu71Δ::URA3</i> und zusätzlich Wildtyp- <i>SNU71</i> auf Plasmid pRS314	Diese Studie
AGY5	<i>MATa/MATα, trp1-Δ/trp1-Δ, his3-Δ/his3-Δ, ura3-52/ura3-52, lys2-801/lys2-801, ade2-101/ade2-101, AAR2/aar2Δ::URA3</i>	Hervorgegangen aus TR1a/α, eine Kopie von <i>AAR2</i> ist zerstört durch Insertion von <i>URA3</i>	Diese Studie
AGY6	<i>MATa/MATα, trp1-Δ/trp1-Δ, his3-Δ/his3-Δ, ura3-52/ura3-52, lys2-801/lys2-801, ade2-101/ade2-101, AAR2/aar2Δ::URA3; plasmid pRS314-GAL1::AAR2-10xHis-C-ter. (ARS/CEN/TRP1)</i>	wie AGY5, trägt jedoch <i>AAR2</i> mit C-terminalem 10x-His-Tag unter dem <i>GAL1</i> -Promotor auf einem <i>TRP1</i> -Plasmid	Diese Studie
AGY7	<i>MATa(?), trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101, AAR2; plasmid pRS314-GAL1::AAR2-10xHis-C-ter. (ARS/CEN/TRP1)</i>	Haploides Isolat aus AGY6, das chromosomales <i>Aar2p</i> exprimiert und in Galaktose <i>Aar2p</i> mit 10x-His-Tag überexprimiert	Diese Studie
AGY8	<i>MATa(?), trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101, aar2Δ::URA3; plasmid pRS314-GAL1::AAR2-10xHis-C-ter. (ARS/CEN/TRP1)</i>	Haploides Isolat aus AGY6, das <i>Aar2p</i> nur Galaktose-induziert mit 10x-His-tag (über)exprimiert	Diese Studie
AGY9	<i>MATa, trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101; SNU17-protA-TRP1</i>	Wie TR2 a, mit Integration des ProtA-Tag und <i>TRP1</i> am 3' -Ende von <i>SNU17</i>	Diese Studie
AGY10	<i>MATa, trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101; YNR5-protA-TRP1</i>	Wie TR2 a, mit Integration des ProtA-Tag und <i>TRP1</i> am 3' -Ende von <i>YNR5</i>	Diese Studie
AGY11	<i>MATa, trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101; YNR5-protA-K.lactis URA3</i>	Wie TR2 a, mit Integration des ProtA-Tag und <i>K.lactis URA3</i> am 3' -Ende von <i>YNR5</i>	Diese Studie
AGY12	<i>MATa, trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101; SNU66-protA-TRP1</i>	Wie TR2 a, mit Integration des ProtA-Tag und <i>TRP1</i> am 3' -Ende von <i>SNU66</i>	Diese Studie
AGY13	<i>MATa, trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101; SPP381-protA-TRP1</i>	Wie TR2 a, mit Integration des ProtA-Tag und <i>TRP1</i> am 3' -Ende von <i>SPP381</i>	Diese Studie
AGY14	<i>MATa, trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101; SNU23-protA-TRP1</i>	Wie TR2 a, mit Integration des ProtA-Tag und <i>TRP1</i> am 3' -Ende von <i>SNU23</i>	Diese Studie
AGY15	<i>MATa, trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101; RSE1-protA-TRP1</i>	Wie TR2 a, mit Integration des ProtA-Tag und <i>TRP1</i> am 3' -Ende von <i>RSE1</i>	Diese Studie
AGY17	<i>MATa/MATα, trp1-Δ/trp1-Δ, his3-Δ/his3-Δ, ura3-52/ura3-52, lys2-801/lys2-801, ade2-101/ade2-101 SNU17/snu17Δ::HIS3</i>	Wie TR1, mit Gen-Deletion von <i>SNU17</i>	Diese Studie
AGY19	<i>MATa/MATα, trp1-Δ/trp1-Δ, his3-Δ/his3-Δ, ura3-52/ura3-52, lys2-801/lys2-801, ade2-101/ade2-101 SNU17/snu17Δ::HIS3 + pRS314 GAL1::SNU17-6xHIS</i>	Wie AGY17, aber trägt noch Plasmid pRS314 <i>GAL1::SNU17-6xHIS</i> (überexprimiert in Galaktose <i>Snu17p</i> mit 6xHis am C-terminus).	Diese Studie
AGY21	<i>MATa(?), trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101 snu17Δ::HIS3</i>	Haploides Isolat aus AGY17 mit Deletion von <i>SNU17</i> , temperatursensitiv über 30°C.	Diese Studie
AGY22	<i>MATa, trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101 HIS3/GAL1::SPP381</i>	Wie YPH499 mit Integration eines <i>HIS3/GAL1</i> -Konstruktes direkt vor das ATG von <i>SPP381</i> .	Diese Studie
AGY23	<i>MATa, trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101 HIS3/GAL1::SNU23</i>	Wie YPH499 mit Integration eines <i>HIS3/GAL1</i> -Konstruktes direkt vor das ATG von <i>SNU23</i> .	Diese Studie
AGY25	<i>MATa, trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101 HIS3/GAL1::SPP381, SNU66::protA-TRP1</i>	Wie AGY22, nur noch mit zusätzlichem Protein A Tag an <i>SNU66</i>	Diese Studie
AGY26	<i>MATa, trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101 HIS3/GAL1::SPP381::protA-TRP1</i>	Wie AGY22, nur noch mit zusätzlichem Protein A Tag an <i>SPP381</i>	Diese Studie
AGY27	<i>MATa, trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101 HIS3/GAL1::SPP381, SNU23::protA-TRP1</i>	Wie AGY22, nur noch mit zusätzlichem Protein A Tag an <i>SNU23</i>	Diese Studie
AGY28	<i>MATa, trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101 HIS3/GAL1::SNU23, SNU66::protA-TRP1</i>	Wie AGY23, nur noch mit zusätzlichem Protein A Tag an <i>SNU66</i>	Diese Studie
AGY29	<i>MATa, trp1-Δ, his3-Δ, ura3-52, lys2-801, ade2-101 HIS3/GAL1::SNU23, SPP381::protA-TRP1</i>	Wie AGY23, nur noch mit zusätzlichem Protein A Tag an <i>SPP381</i>	Diese Studie

3.1.2.2 Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

Stamm HB101

Stamm BL-21

3.1.3 Plasmide

In der folgenden Tabelle indiziert "gen" jeweils ein Gen, das inklusive seiner flankierenden Regionen (jeweils bis zum Anfang oder Ende der kodierenden Sequenz der vorhergehenden und nachfolgenden Gene) kloniert wurde. "cod.reg." indiziert die Klonierung nur der kodierenden Region eines Gens (zwischen Start und Stopcodon).

Vektorname	Klonierungsstellen	Beschreibung
pBlscr II SK ⁺ T7 yUIC cod.reg.	Xho I => Sac I	yU1 C kodierende Region unter T7 Promotor
pBlscr II SK ⁺ T7 yUIC cod.reg.+ NFluTag	Xho I => Sac I	yU1 C mit Flu-Tag am N Terminus unter T7 Promotor
pBlscr II SK ⁺ T7 yUIC cod.reg.+ CFluTag	Xho I => Sac I	yU1 C mit Flu Tag am C-Terminus unter T7 Promotor
pBlscr II SK ⁺ T7 yUIC cod.reg. C6S	Xho I => Sac I	yU1 C mit Punktmutation C6 zu S6 unter T7 Promotor
pBlscr II SK ⁺ T7 yUIC cod.reg. C9S	Xho I => Sac I	yU1 C mit Punktmutation C9 zu S9 unter T7 Promotor
pRS316-SNU71 gen	Xho I => Sac II	SNU71 Gen + 5' - und 3' - UTRs
pGEX-4T1-SNU71 cod.reg.	BamHI => Xho I	Expressionsvektor GST-SNU71
pRS316 snu71Δ::URA3	XhoI => SacII	snu71 Deletion durch URA3 zwischen HindIII und BglII
pRS314 SNU71 gen	XhoI => SacII	SNU71 Gen + 5' - und 3' -UTRs
pRS314 snu71 Δ::URA3	XhoI => SacII	snu71 Deletion durch URA3 zwischen HindIII und BglII
pRS316-SNU56 gen	XhoI => SacI	SNU56 Gen + 5' - und 3' - UTRs
pGEX-4T1-SNU56 cod.reg.	BamHI => XhoI	Expressionsvektor GST-SNU56
pQE-30-SNU56 cod.reg. + N HisTag	BamHI=>"XhoI/SalI"	Expressionsvektor 6xHis-SNU56; XhoI-Stelle in SalI ligiert
pGEX-4T1-prp8 N Term 88 aa	BamHI => XhoI	Expressionsvektor GST-PRP N-Terminus (88 AS, Prolinreich)
pRS306-MUD1 gen	KpnI => SacI	MUD1 Gen + 5' - und 3' - UTRs (inklusive Intron)
pRS306-NAM8 gen	KpnI => SacI	NAM8 Gen + 5' - und 3' - UTRs
pRS306-nam8Δ::URA3	KpnI => SacI	nam8Δ + 5' - und 3' - UTRΔNAM8-Delet. URA3 zw. BamHI und HpaI
pRS306-nam8Δ::HIS3	KpnI => SacI	nam8Δ + 5' - und 3' - UTRΔNAM8-Delet. HIS3 zw. BamHI und HpaI
pGEX-4T1-NAM8 cod.reg.	EcoRI => SalI	Expressionsvektor GST-NAM8
pGEX-4T1-nam8 Δ C Term	EcoRI => "EcoRI/SalI"	Expressionsvektor GST-nam8; C-Terminus deletiert ab Ala386 (EcoRI/SalI ausgeschnitten, Klenow aufgefüllt, blunt-end Religation)
pGEX-4T1-nam8 Δ RBD3	EcoRI => SalI	Expressionsvektor GST-nam8; 3.RBD deletiert ab Leu270 (StyI/SalI ausgeschnitten, Klenow aufgefüllt, blunt-end Religation)
pRS306-AAR2 gen	Xho I => SacI	AAR2 Gen + 5' - und 3' - UTRs
pGEX-4T1-AAR2 cod.reg.	BamHI => XhoI	Expressionsvektor GST-AAR2
pRS306-aar2Δ::URA3	XhoI => SacI	aar2 Deletion durch URA3 zwischen SphI und Eco47III
pRS314-GAL1::AAR2-10xHis C-Term.	XhoI => BamHI	ARS/CEN/TRP1 Vektor mit Aar2-10xHisTag am C - Terminus unter Kontrolle des GAL1 Promotors; ACHTUNG: Zwei T7 Promotoren
pBlscr II SK ⁺ T7 MATA1 cod.reg.	XhoI => SacI	MATA1 kodierende Region unter T7 Promotor (hat zwei Introns)
pRS306-NPL3 gen	XhoI => SacI	NPL3 Gen + 5' - und 3' - UTRs
pGEX-4T1-NPL3 cod.reg.	BamHI => XhoI	Expressionsvektor GST-NPL3
pGEX-4T1-npl3 Δ RGG	BamHI => "BsaBI/XhoI"	Expressionsvektor GST-npl3 C-terminale RGG Box deletiert ab Arg272 (BsaBI/XhoI ausgeschnitten, Klenow, blunt end Religation)
pGEX-4T1-PRP42 cod.reg.	BamHI => SalI	Expressionsvektor GST-PRP42/SNU65
pGEX-4T1-SNU66 cod.reg.	BamHI => XhoI	Expressionsvektor GST-SNU66
pGEX-4T1-SNU17 cod.reg.	BamHI => XhoI	Expressionsvektor GST-SNU17
pGEX-4T1-YNR5 cod.reg.	BamHI => XhoI	Expressionsvektor GST-YNR5
pRS314-GAL1::SNU66	BamHI => XhoI	ARS/CEN/TRP1 Vektor mit Snu66p unter Kontrolle des GAL1 Promotors; ACHTUNG: Zwei T7 Promotoren
pRS314-GAL1::SNU17-6xHis C-Term.	BamHI=>XhoI	ARS/CEN/TRP1 Vektor mit Snu17-6xHisTag am C - Terminus unter Kontrolle des GAL1 Promotors; ACHTUNG: Zwei T7 Promotoren
pT7T3-Pac hEST #214469 (hPRP40 ?)	EcoRI=>EcoRI	potentielles humanes Homologes von PRP40, EST-Klon 214469
pRS306-URA3 BamHI/HpaI	BamHI => HpaI	Zweite Kopie von URA3 im Vektor zwischen Position 182 und 1294
pRS314-GAL1 promotor (P.Fabrizio)	XhoI => BamHI	ARS/CEN/TRP1 Plasmid mit GAL1 Promotor und MCS aus pYES2 zwischen XhoI und BamHI von pRS314 kloniert
pRS316/114derXbaEcoN+His (P.Fabrizio)		diente lediglich als Templat zur Gewinnung von HIS3
pSp6 Aktin (P.Fabrizio)		Vom Aktin-Gen abgeleitete Sequenz mit verkürzten Exons, inklusive des Introns unter dem Sp6 Promotor; mit EcoRI linearisieren für <i>in vitro</i> Transkription von Aktin prä-mRNA
pUC18-T7 U1 cod.reg. (Dr. P.Fabrizio)		kodierende Region der U1 snRNA; zur T7 <i>in vitro</i> -Transkription mit PvuII linearisieren, für Random-Primer Labeling von U1-Sonden mit HindIII/EcoRI ausschneiden
pUC18-T7 U2 cod.reg. (Dr. P.Fabrizio)		wie oben, U2 Sequenz; T7: XhoI; Sonden: PstI/XhoI isolieren
pUC18-T7 U4 cod.reg. (Dr. P.Fabrizio)		wie oben, U4 Sequenz; T7: StyI; Sonden: EcoRI/BamHI isolieren
pUC18-T7 U5 cod.reg. (P.Fabrizio)		wie oben, U5 Sequenz; T7: DraI; Sonden: PvuII isolieren
pUC18-T7 U6 cod.reg. (Dr. P.Fabrizio)		wie oben, U6 Sequenz; T7: BamHI; Sonden: EcoRI/HindIII isolieren
pBlscr II SK ⁺ HIS3/GAL1	SacI => SpeI	HIS3/GAL1 Konstrukt (Orientierung: 3' HIS3-5' /5GALI-3')
pBS 1365 (ProtA-K.lactis URA3) (Dr. Bertrand Séraphin)	SacI => ApaI	2xlgG Bindungsdomäne von <i>S.aureus</i> Protein A und <i>K.lactis</i> URA3 in pBlscr II SK ⁺ Vektor; schneiden Bsp120I, Klen. füllen, Lig.an 3' -UTR
pBS 1173 (ProtA-S.cer. TRP1) (Dr. Bertrand Séraphin)	SacI => EcoRI	2xlgG Bindungsdomäne von <i>S.aureus</i> Protein A und <i>S.cer.</i> TRP1 in pRS403; schneiden mit EcoRI, Klenow auffüllen für Lig. mit 3' -UTR

Oligo	Beschreibung	Sequenz (5' => 3')
1	HIS3 gen up BamHI	CCGCCGGATCCGTTTAAAGAGCTTGGTGA
2	HIS3 gen low HpaI	CCGCCGTTAACTCGAGTTCAAGAGAAAAA
3	HIS3 gen up BsrGI	GGCGGTGTACATCTAGAAAGAGCTTGGTG
4	HIS3 gen low AatII	GGCGGGACGTCGTATCGAGTTCAAGAGAA
5	HIS3 gen low BsrGI	GGCGGTGTACAGTATCGAGTTCAAGAGAA
6	HIS3 gen low SalI	GGCGGGTCGACGTATCGAGTTCAAGAGAA
7	URA3 gen up BamHI	GGCGGGGATCCACGCTTTTCAATTCAATT
8	URA3 gen low HpaI	GGCGGGTTAACAGGGTAATAACTGATATA
9	URA3 gen up ClaI	GGCGGATCGATACGCTTTTCAATTCAATT
10	URA3 gen up SphI	GGCGGGCATGCACGCTTTTCAATTCAATT
11	URA3 gen low Eco47III	GGCGGAGCGCTAGGGTAATAACTGATATA
12	yU1C cod.reg. up XhoI	GCCGCCTCGAGATGACGAGATACTATTGT
13	yU1C cod.reg. low SacI	GGCCCGAGCTCTTAATTTCCATACCGCCTCC
14	yU1C + N FluTag up XhoI	GGCCGCTCGCGATGTACCCATACGACGTCCAGACTACGCTACGAGATACTATTGTGAA
15	yU1C + C FluTag low SacI	GGCCCGAGCTCTTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAATTTCCATACCGCCTCC
16	yU1C C6S up XhoI	GCCGCCTCGAGATGACGAGATACTATAGTGAATACTGTCAATCG
17	yU1C C9S up XhoI	GCCGCCTCGAGATGACGAGATACTATTGTGAATACAGTCAATTCGATTTGACC
18	yU1C + N FluTag C6S up XhoI	GGCCGCTCGCGATGTACCCATACGACGTCCAGACTACGCTACGAGATACTATAGTGAATACTGTCAATCG
19	SNU71 gen up XhoI	GGCCCTCGAGCATAGATGTATAAATCAG
20	SNU71 gen low SacII	GCCCGCCGCGGAGATGGGTATAATTAGGA
21	SNU71 cod.reg. up BamHI	GGCCGGGATCCATGAGGGATATTGTATTT
22	SNU71 cod.reg. low XhoI	GGCCGCTCGAGTCAAGTCCCCAAGCGAAA
23	SNU56 gen up XhoI	GGCCGCTCGAGGGTGAATAATTGTATGAT
24	SNU56 gen low SacI	CGCCGAGCTCCAGTGTATTATTAGACTT
25	SNU56 cod.reg. up BamHI	GGCCGGGATCCATGCGCCCAAGAAGGAGA
26	SNU56 cod.reg. low XhoI	GGCCGCTCGAGTCAATGTTCTAATATATT
27	PRP8 N Term 88 up BamHI	CGCCCGGATCCATGAGTGGACTACCGCCC
28	PRP8 N Term 88 low XhoI	CGCCCTCGAGTCTGCTTTAGTCTCTAA
29	MUD1 gen up KpnI	GGGGGGGTACCTAAGAGTAATAATTATTG
30	MUD1 gen low SacI	GGGGGGAGCTCTAAAGAGCACATTATTT
31	NAM8 gen up KpnI	GGGGGGGTACCTGACGTTTCAATAAGAATA
32	NAM8 gen low SacI	GGGGGGAGCTGCTTGTATTTTATTGTGT
33	NAM8 cod.reg. up EcoRI	GGCCCGAATTCATGCTCCTATAAACAAACA
34	NAM8 cod.reg. low SalI	GGCCCGTCGACCTCAAGCAACATAAAACC
35	PRP40 gen up XhoI	GGCCCTCGAGTTCCTACTATCAGTTGCT
36	PRP40 gen low SacII	GGCCCGGCGCCTAAGAAATTTGCGGTGA
37	hPRP40 up (für PCR aus λ-Phagen Bank)	AAGCCTTACTATTATAAT
38	hPRP40 low (dto.)	CCCATGAAGCATTCGATG
39	SNP1 gen up ClaI	GGCCCATCGATTTTATATTATGTTAATATCA
40	SNP1 gen low SacI	GGCCCGAGCTCTGCTTGATCGTTCGCGTG
41	NPL3 gen up XhoI	GGCCCTCGAGTGAGAAAAATAATTTCCT
42	NPL3 gen low SacI	GGCCCGAGCTCTATTCTGGCGTGAATCC
43	NPL3 cod.reg. up BamHI	GGCCGGGATCCATGTCTGAAGCTCAAGAA
44	NPL3 cod.reg. low XhoI	GGCCGCTCGAGTTACCTGGTTGGTGATCT
45	PRP39 gen up XhoI	GGCCCTCGAGTATTTAGCGCTTTGTGT
46	PRP39 gen low SacI	GGCCGAGCTCTATTTTTTTTAATTAC
47	PRP42 cod.reg. up BamHI	CGCCGGGATCCGATAAAATACTGCTTTG
48	PRP42 cod.reg. low SalI	CGCGGTCGACCCTAAGGTCTTCAGTAAA
49	AAR2 gen up XhoI	GGCCCTCGAGTAGATGAAATGAAATAC
50	AAR2 gen low SacI	GGCCGAGCTCTTTCTTTGTAGCGTTTA
51	AAR2 cod.reg. up BamHI	GCCCGGGATCCATGAATCATGTACCATTT
52	AAR2 cod.reg. low XhoI	GGCCGCTCGAGTTATGGCCTTTGGTAATA
53	AAR2 10xHis CTerm. low XhoI	GCCGCCTCGAGTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGGCCTTTGGTAATAGAG
54	MATA1 cod.reg. up XhoI	GGCCCTCGAGATGGATGATTTGTAGT
55	MATA1 cod.reg. low SacI	GGCCCGAGCTCTATTAGATCTCATACGTTTATT
56	MATA1 exon 3 primer	TTTAGATCTCATACGTTATTTAT
57	oligo Kill U2 (SR U2)	CAGATACTACACTTG
58	oligo Kill U6 (d1)	ATCTCTGTATTGTTCAAATTGACCAA
59	oligo Kill U4 I (i)	GATTATGCTGAGTGATATCCTAGGAATACGTGCCCTTTATGCGTATAGTC
60	oligo Kill U4 II (o)	ATTTGGTCTGGCAGAGGAGTACCAGTTAAGCCACAAGCGAAAACTTA
61	SNU66 HIS3/GAL1 up	TATTTGATATTAATAAAAAGGCAATCATCATCAACCTTAATTAATTTGGGCGAATTGGAGCTCCAC
62	SNU66 HIS3/GAL1 low	TCCCTTATTTTCATTGTCTCCTCAATAGAAAGGTTTTCCGTTTTGTTCATCGGGGGATCCCACTAGTTCTAGA
63	SPP381 HIS3/GAL1 up	CCACCGCTAGATATAAGAAATTTTTTGGTTACTGATTGAATCACATACGGGGCGATTGGAGCTCCAC
64	SPP381 HIS3/GAL1 low	TCATCTCTGAGCTGTGTGCAAGTCTCCTCTTGAAATGTCTAAACTCATCGGGGGATCCCACTAGTTCTAGA
65	SNU23 HIS3/GAL1 up	AAAACCGAAGTTCCTACAAGCCTTAGCTGACAAAAATTCGAGAAAGCTAGGGCGCAATTGGAGCTCCAC
66	SNU23 HIS3/GAL1 low	TGCTCAGCATACTCCTCTCTATCCCAAGTTCTTGCCAAAAATTCGACATCGGGGGATCCCACTAGTTCTAGA
67	SNU66 B1	CCTAATCAGCAAATTTCTA
68	SNU66 B2	AGGCCGGTATTGTTCTC
69	SNU66 B3	AGGAAAAATACCCCTGAAAAATGGTAGTTTGTGTAATTTGATGACAATAAGCTGGAGCTCAAAAC
70	SPP381 B1	CACCGCATCACACACACA
71	SPP381 B2	TGGGGAATTTGACGCGCG
72	SPP381 B3	CTAGGCAAGAATAGTAGAGATTACGAAGAAACTGAATATTCGGTTATAAAGCTGGAGCTCAAAAC
73	SNU23 B1	GAAACCAAGTAAAGATAA
74	SNU23 B2	ACTGAAATTTTGAATAT

75	SNU23 B3	AAAGTCAGTCAAATGATGGGATTTTCCAATTTTGCCACCTCTAAAAAAGCTGGAGCTCAAAAC
76	SNU17 B1	ATAATTTTTCCTTCATC
77	SNU17 B2	GCTACTGCCGTGCAAAAA
78	SNU17 B3	AAGAACAATGCTGAGAACTCATTTTGGCTAAAAAGGACCAACCACCTCCGCTGGAGCTCAAAAC
79	RSE1 B1	TGATTTTACAGTAATAAT
80	RSE1 B2	CATGAAGTGATCATAGA
81	RSE1 B3	GTGGAGGATATAATTCAAACAATCAACGAAGTCAGAACAAATTACATGAAGCTGGAGCTCAAAAC
82	YNR5 B1	TCAGCGTGAAGTACTGT
83	YNR5 B2	ATGGCCAAAATAATTACT
84	YNR5 B3	GGTTCTGACGTATTGTCCCATCACAAGGTAAGAAAGTGAAGTTTGACAAGCTGGAGCTCAAAAC
85	HS49 B1	GATCCCGCTCTACCTAG
86	HS49 B2	TCAAACCAGAAGTATTGG
87	HS49 B3	GTTGACAGGCTGTTGAATAAAGAAGCATTAAAGCACAACATGTTGAAAAAGCTGGAGCTCAAAAC
88	SNU66 gen up BamHI	GGCGGGGATCCGTAAATTAGTGCTGTACG
89	SNU66 gen low XhoI	GGCGGCTCGAGTGTAGGCCGGTATTGTT
90	SNU66 cod.reg. up BamHI	GGCGGGGATCCACCAAAACGGAAACCTT
91	SNU66 cod.reg. low XhoI	GGCGGCTCGAGTTAATTGTCTCAAAATTC
92	SNU17 cod.reg. up BamHI	GGCGGGGATCCAAACAAATTCAGCAATC
93	SNU17 cod.reg. low XhoI	GGCGGCTCGAGTTAATTGGTTGGTCCTT
94	YNR5 cod.reg. up BamHI	GGCGGGGATCCTCAGAAACAGAACTGTCG
95	YNR5 cod.reg. low XhoI	GGCGGCTCGAGTTAGTCAAACCTTCACTTT
96	SNU17 5' -UTR up	GAAGAGCTGAAGCAATGA
97	SNU17 5' -UTR HIS low	TTCTAGATGTACACCGCCGAATTGCACGCTGCACTT
98	SNU17 3' -UTR HIS up	TCGATACGACGTCCCGCCGAACAATGCTGAGAACTC
99	SNU17 3' -UTR low	AGCTTTAGCTGGAGGCGT
100	SNU17 6xHis C-Term low XhoI	GGCGGCTCGAGGCGACGGCGACGAGATTGGTTGGTCCTTTTAGCC
101	Oligo U5 (3' -Ende U5 S)	AGTTCCAAAAAATATGGCAAG
102	Oligo 3' -Exon U3	CCAAGTTGGATTCAGTGGCTC

3.1.5 Nukleotide

Nukleotide:

Desoxynukleotid-5' -Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Nukleosid-5' -Triphosphate (ATP, CTP, GTP, UTP)	Amersham Pharmacia, Freiburg
m ⁷ G-Nukleotid	Amersham Pharmacia, Freiburg
Biotin-16-UTP	Boehringer, Mannheim

Radionukleotide:

[α- ³² P]dATP; 3000 Ci/mmol	Amersham, Braunschweig
[α- ³² P]UTP; 3000 Ci/mmol	Amersham, Braunschweig
[γ- ³² P]dATP; 5000 Ci/mmol	Amersham, Braunschweig

3.1.6 Antiseren und monoklonale Antikörper

mAK "H20" (Anti-"Kappen"-AK)	AG Lührmann, Marburg
Peroxidase-anti-Peroxidase Komplex (PAP)	Sigma
anti-Kaninchen-IgG Antikörper, Peroxidase-gekoppelt	Amersham, Braunschweig
anti-Maus-IgG Antikörper, Peroxidase-gekoppelt	Amersham, Braunschweig
anti-Snu71p Kaninchen-Antiserum ("Nelson")	Diese Studie
anti-Snu56p Kaninchen-Antiserum ("Hobbes II")	Diese Studie
anti-Nam8p Kaninchen-Antiserum ("Calvin")	Diese Studie
anti-Npl3p Kaninchen-Antiserum ("Derrick")	Diese Studie
anti-Aar2p Kaninchen-Antiserum ("Harry")	Diese Studie
anti-Snu114p Kaninchen-Antiserum ("Camillo")	Dr. P. Fabrizio
anti-Prp8p Kaninchen-Antiserum	Prof. Dr. J.D. Beggs, Edinburgh

3.1.7 Kits

ECL - Detektions Kit	Amersham, Braunschweig
PRIME-IT II Random Primer Labeling Kit	Stratagene, Heidelberg
Ribomax - Kit	Promega
Nucleobond AX Maxiprep-Kit	Macherey & Nagel
GFX-PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Pharmacia, Freiburg

3.1.8 Enzyme und Enzyminhibitoren

AMV-Reverse Transkriptase	USB, Cleveland, Ohio	RNase A	Promega, USA
DNA Polymerase (Klenow Fragment)	Stratagene, Heidelberg	RNasin	Promega, USA
DNaseI	Boehringer, Mannheim	RNase T1	Promega, USA
Klenow-Enzym	NEB, Schwalbach	T4-DNA Ligase	MBI, Fermentas
Pepstatin	Boehringer, Mannheim	T4-Polynukleotidkinase	NEB, Schwalbach
Pfu-DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg	T7-RNA Polymerase	NEB, Schwalbach
Proteinase K	Boehringer, Mannheim	Taq-DNA Polymerase	Promega, USA
Restriktionsendonukleasen	NEB, Schwalbach	Sp6-RNA Polymerase	NEB, Schwalbach
	Boehringer, Mannheim	Zymolyase 100-T	Seikagaku Kogyo, Japan

3.1.9 Geräte

Autoklav	Tecnomara, Schweiz	Röntgenfilm Biomax	Kodak, USA
Biofuge A	Heraeus, Hanau	Sorvall RC 5B Zentrifuge	Du Pont, USA
Fraktionssammler FRAC-100	Pharmacia, Freiburg	Sorvall GSA-Rotor	Du Pont, USA
Fraktionssammler Multirac-211	Pharmacia, Freiburg	Sorvall GS3-Rotor	Du Pont, USA
Gelelektrophoreseapparaturen	Bio-Rad, München	Sorvall HB-4 Rotor	Du Pont, USA
	Hoefer Scientific Instrum. USA	Sorvall SS-34 Rotor	Du Pont, USA
	Institutswerkstatt	Speed Vac Konzentratoren	Savant
Geltrockner Modell 583	Bio-Rad, München	Spektrophotometer Ultrospec II	LKB/Pharmacia, Freiburg
Gradient Master Modell 106	BioComp Instruments	Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
Heizblock Dri-Block DB-3	Techno, UK	SW40 Ti Rotor	Beckman, USA
Hochspannungstransformatoren	Pharmacia, Freiburg	Szintillationszähler LS 1701	Beckman, USA
Hybridisierungsöfen	Hybaid Biometra, UK	70 Ti Rotor	Beckman, USA
Inkubationsschränke	New Brunswick Scientific, Edison, USA	TLS55 Rotor	Beckman, USA
	Heraeus, Hanau	TRANS-BLOT Cell	Bio-Rad, München
Inkubationsschrank ohne Schüttler	Heraeus, Hanau	Ultrazentrifuge L60	Beckman, USA
Minifuge 2	Heraeus, Hanau	Ultrazentrifuge TL500	Beckman, USA
Peristaltische Pumpe P-1	Pharmacia, Freiburg	UV-Lampe	Bachofner, Reutlingen
Röntgenfilm X-Omat	Kodak, USA	Vortex	Janke und Kunkel, Staufen i. Br.

3.1.10 Arbeitsmaterialien

Reaktionsgefäße (verschiedene Größen)	Eppendorf, Hamburg	Pipetten (verstellbar)	Gilson Medical Electronics, FRA
Dialysemembran, Ausschluß 6-8000 kDa	SpektraPor, USA	NucTrap Push Columns	Stratagene, Heidelberg
Dounce Homogenisator	Wheaton, USA	Qiabran-Nylon Membran	Diagen, Düsseldorf
Kassetten zur Filmexposition	Kodak, USA	Quick sep Columns	Isolab, USA
Nescofilm	Roth, Karlsruhe	Whatman DE 81 Ionenaustauschpapier	Whatman Paper, UK
Protran Nitrozellulose Membran	Schleicher & Schüll, Dassel	Whatman 3MM Papier	Whatman Paper, UK
ProbeQuant G50 Spin-Säulen	Pharmacia, Freiburg		

3.2 Methoden

3.2.1 Proteinbiochemische Standardmethoden

3.2.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinen in wässriger Lösung erfolgte mittels dem Bradford-Assay und photometrischer Messung bei 595 nm. Zur Eichung diente eine Standardmessreihe verschiedener Lösungen bekannter Konzentrationen an BSA.

Farbstofflösung für Bradford-Protein Assay: Firma Bio-Rad, München

3.2.1.2 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCA-) Extraktion

Zur Trennung und Reinigung von Proteinen und Nukleinsäuren wird die Probe gegebenenfalls mit Wasser auf 500 µl aufgefüllt und mit 200 µl PCA-Lösung versetzt. Die Mischung wird intensiv geschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (5 min, 13000 U/min). Aus der oberen, wässrigen Phase können Nukleinsäuren durch Zugabe von 2,5 Volumina Ethanol mit 50 mM NaOAc, pH 5,3 ausgefällt werden, aus der unteren, organischen Phase werden die Proteine durch Zugabe von 5 Volumina Aceton ausgefällt. Die Präzipitate werden abzentrifugiert (15 min, 13000 U/min), mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, abzentrifugiert und im Vakuum für 3-5 min getrocknet.

PCA-Extraktionslösung: 50 % (v/v) Phenol
48 % (v/v) Chloroform
2 % (v/v) Isoamylalkohol
Gesättigt mit TE Puffer

TE Puffer: 10 mM Tris, pH 7.5
1 mM EDTA

3.2.1.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Die SDS-PAGE wurde auf 13% Polyacrylamidgelen (37,5:1 Acrylamid:Bisacrylamid) mit hohen Konzentrationen an TEMED (0,33 vol%; zur besseren Auftrennung von kleinen Proteinen) durchgeführt. Die Gele waren 0,5 oder 1 mm dick und bestanden aus Trenngel und Sammelgel. Zur Glättung der Trenngelkante wurde mit etwas wassergesättigtem sek.-Butanol überschichtet. Die trockenen Proteinpellets wurden in 8 µl Proteinprobenpuffer aufgenommen und für 10 min zur vollständigen Denaturierung und zur Reduktion von Cystinbrücken durch Dithiothreitol (DTT) auf 65°C erhitzt.

Trenngellösung: 375 mM Tris/HCl, pH 8.8
0,1 % (w/v) SDS
12,66 % (w/v) Acrylamid
0,34 % (w/v) Bisacrylamid
auf 30 ml Lösung: 100 µl APS (10 %ig), 100 µl TEMED

Sammelgellösung: 125 mM Tris/HCl, pH 6.8
0,1 % (w/v) SDS
4,87 % (w/v) Acrylamid
0,13 % (w/v) Bisacrylamid
auf 10 ml Lösung: 50 µl APS (10 %ig), 25 µl TEMED

Proteinlaufpuffer:	25 mM	Tris/HCl, pH 8.8
	192 mM	Glyzin
	0.1 % (w/v)	SDS
Protein-Probenpuffer:	60 mM	Tris/HCl, pH 6.8
	1 mM	EDTA
	2 % (w/v)	SDS
	16 % (v/v)	Glyzerin
	0.1 % (w/v)	Bromphenolblau
	50 mM	DTT

Die Gele wurden entweder mit herkömmlichem Coomassie-Brilliantblau oder, falls die Proteinbanden massenspektrometrisch analysiert werden sollten, mit Coomassie-G Kolloidal-Konzentrat angefärbt. Ansonsten wurden die Proteine nach einer Methode, die in Electrophoresis **8** (1987) 93-99 beschrieben ist, mit Silber gefärbt. Die Gele wurden im Vakuum bei 80°C auf Filterpapier getrocknet.

3.2.1.4 Western Blot und ECL (enhanced chemiluminescence) Detektion

Western Blot-Analysen von Proteinen aus Zellextrakten oder Immunpräzipitaten erfolgten nach herkömmlichen Vorschriften [130]. Die Proteine wurden im Naßblotverfahren in Kammerpuffer auf Nitrozellulosemembranen übertragen (bei ca. 70 Volt für 2 Stunden oder bei 25 Volt über Nacht). Die Membran wurde mit Trockenmilchlösung (in TBS-T) unspezifisch blockiert, gewaschen (stets TBS-T) und dann mit Antikörpern oder polyklonalen Antisera variierender Verdünnung inkubiert. Nach Waschen wurde die Membran mit Peroxidase-gekoppelten sekundär-Antikörpern inkubiert, die spezifisch die Fc-Region von Kaninchen- oder Maus-IgGs binden (Verdünnung 1:50000). Die Detektion erfolgte durch ECL nach dem Protokoll des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Zum Nachweis von Protein A Fusions-Proteinen wurde die Membran nach dem Transfer mit einem löslichen Immunokomplex von Peroxidase und anti-Peroxidase-Antikörpern (PAP, SIGMA) in einer 1:2000 Verdünnung inkubiert. Diese erzeugen eine "Sphäre" von Peroxidase-molekülen um jedes Protein A, was zu einer Verstärkung des Signals führt. Nach dem Waschen wurde die Membran direkt zur ECL-Detektion verwendet.

Kammerpuffer:	50 % (v/v)	SLAB 4
	20 % (v/v)	Methanol
SLAB 4:	50 mM	Tris-HCl, pH 8.5
	380 mM	Glyzin
	0,1 % (w/v)	SDS
TBS-T:	20 mM	Tris-HCl, pH 7.5
	150 mM	NaCl
	0,05 % (v/v)	Tween 20

3.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

3.2.2.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurde die Extinktion der entsprechenden wäßrigen Lösung bei 260 nm gegen Wasser als Referenz gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht bei

- doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg / µl

- einzelsträngiger DNA einer Konzentration von 37 µg / µl
- einzelsträngiger (strukturloser) RNA einer Konzentration von 40 µg / µl
- Oligonukleotiden einer Konzentration von 30 µg / µl.

3.2.2.2 Extraktion von Nukleinsäuren (PCA-Extraktion)

siehe 3.2.1.2

3.2.2.3 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Agarosegelelektrophorese von Plasmiden, Restriktionsverdau- oder PCR-Produkten wurde nach Standardprotokoll [131] in Gelen durchgeführt, die zwischen 0,8 und 1,5 % Agarose enthielten. Die Gele enthielten zur Detektion der DNA 0,05 % Ethidiumbromid. Gel- und Kammerpuffer war 1xTBE, die DNA-Proben wurden in Agarosegelprobenpuffer aufgenommen.

10x TBE-Puffer:	0.89 M 0.89 M 25 mM es resultiert pH 8,3	Borsäure Tris EDTA
Gellösung:	1x TBE 0,8 - 1,5 % (w/v)	Agarose
Kammerpuffer:	1x TBE 0,05 % (w/v)	Ethidiumbromid
5x Agarose Gel Probenpuffer:	30 % (v/v) 0,25 % (w/v) 0,25 % (w/v)	Glyzerin Bromphenolblau Xylencyanol

3.2.2.4 Denaturierende Elektrophorese von RNA und DNA im Harnstoffgel

RNA-Fragmente bis zu 2000 nt (aber auch DNA-Oligonukleotide) können in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen aufgetrennt werden. In 8M Harnstoff werden Sekundärstrukturen der RNA denaturiert, die Elektrophorese erfolgt vertikal in 0,5 mm dicken, je nach Länge der aufzutrennenden RNAs 5-20 %igen Acrylamidgelen (bei snRNAs und prä-mRNA Spleißprodukten 8 %) mit 1xTBE als Gel- und Laufpuffer. Die RNA Proben werden in 6 µl Formamid-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min auf 65 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgt z.B. bis der Xylencyanol-Farbstoff am unteren Gelrand angelangt ist (entspricht RNAs von ca. 80 nt Länge). Die RNAs können, nach Inkubation des Gels in einer Ethidiumbromidlösung, durch UV-Licht oder durch Silberfärbung nach [132] sichtbar gemacht werden.

10x TBE: siehe 3.2.2.3

Gellösung:	1x TBE 8 M 4,87 - 19,48 % (w/v) 0,13 - 0,52 % (w/v) pro 20 ml Gellösung: 100 µl APS (10%ig), 10 µl TEMED	Harnstoff Acrylamid Bisacrylamid
Laufpuffer:	1x TBE	
Formamid-Probenpuffer:	0.5x TBE 80 % (v/v) 0,1 % (w/v) 0,1 % (w/v)	Formamid Xylencyanol Bromphenolblau

3.2.2.5 Nichtdenaturierende Gelelektrophorese von RNA-Duplices

Um RNA-Sekundärstrukturen und RNA-RNA-Duplices gelelektrophoretisch untersuchen zu können, müssen Bedingungen gewählt werden, die die RNA im nativen Zustand erhalten. Ein diesen Bedingungen genügendes Gel enthält 9 % Acrylamid (AA:BAA 30:1), 50 mM TRIS/Borat (pH 8,3), 1mM EDTA und 0,02 % SDS (in Anlehnung an [133]). Zur Analyse der Basenpaarung zwischen U4 und U6 snRNAs wurde ein 0,4 mm dickes, 16 cm breites und 22 cm langes Gel benutzt, der Laufpuffer hatte die gleiche Zusammensetzung wie der Gelpuffer, und die Elektrophorese erfolgte für 2 h 45 min bei 550 Volt und 4°C. Die snRNAs müssen ebenfalls im nativen Zustand erhalten werden. Daher erfolgt die PCA-Extraktion bei 4°C und die Proben werden nach Fällung nur moderat in einem speziellen Probenpuffer auf 30°C erwärmt.

Probenpuffer für native RNA-Proben:	0,1 %	SDS
	100 mM	NaCl
	50 mM	TRIS/Borat (pH 8,3)
	36,6 % (v/v)	Glyzerin

3.2.2.6 Transformation von Plasmiden in Bakterien sowie deren Isolierung

Plasmide wurden nach dem Protokoll von [134] in verschiedene Bakterienstämme transformiert, Bakterien waren nach der Calciumchlorid-Methode kompetent gemacht worden [134]. Zur Isolierung der Plasmide im Mini- oder Maximaßstab wurde die alkalisch Lyse nach dem Protokoll von [135] verwendet. Für Maxi-Präparationen wurde ein Kit der Firma Macherey & Nagel verwendet (Nucleobond AX Kit).

3.2.2.7 Restriktionsverdau von Plasmiden / DNA, Reinigung von Restriktionsprodukten und Ligation

Die Restriktionsreaktionen mit den entsprechenden Enzymen erfolgten jeweils nach den Vorgaben der Hersteller (z.B. New England Biolabs). Zur Isolierung bestimmter Restriktionsfragmente oder auch PCR-Produkte wurden die Reaktionsmischungen auf Agarosegelen aufgetrennt, die Banden mit UV-Licht geringer Energie visualisiert und die Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde aus dem Gel (oder auch aus der PCR-Reaktionsmischung) mit Hilfe eines Kits (GFX-PCR DNA and gel band purification Kit, Amersham Pharmacia) über Zentrifugationssäulen isoliert. Es wurde dabei nach den Angaben des Herstellers verfahren. Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Plasmide erfolgte bei 16°C über Nacht mit T4-DNA Ligase [131].

3.2.2.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

PCR Reaktionen wurden mit verschiedenen Templaten, zumeist mit isolierter genomischer DNA aus Hefe, aber auch mit Plasmiden durchgeführt [131]. Je nach Zweck wurden Taq- oder Pfu-Polymerase verwendet: Taq Polymerase nur zu Analysezwecken, z.B. um zu ermitteln, ob ein bestimmtes DNA-Konstrukt korrekt in den entsprechenden Hefestamm integriert wurde. Wurde das DNA-Stück oder Gen für funktionelle Experimente gebraucht, so wurde Pfu-Polymerase verwendet, da diese aufgrund der Proofreading-Aktivität nur sehr wenige Fehler im Produkt erzeugt. Typische Reaktionsansätze und PCR-Programme für Reaktionen mit den beiden Enzyme:

Reagenz	Ansatz für Taq	Ansatz für Pfu
DNA-Templat chromosomale DNA 0,8 µg/µl oder Plasmid DNA 0,1µg/µl	2,5 µl 5 µl	0,5 µl 1 µl
10 x Taq Puffer	10 µl	-
10 x Pfu Puffer	-	10 µl
10 x dNTPs (je 1,25 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	16 µl	16 µl
Primer 1 (20 pmol/µl)	5 µl	2,5 µl
Primer 2 (20 pmol/µl)	5 µl	2,5 µl
H ₂ O	60,5 bzw. 58 µl	66,5 bzw. 66 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	1 µl	-
Pfu Polymerase (2,5 U/µl)	-	2 µl

Zyklus	Programm für Taq	Programm für Pfu
1x	95°C; 5'	94°C; 45''
30x	95°C; 30'' 45-55°C; 30'' 72°C; 30'' / kb	94°C; 45'' 45-55°C; 45'' 72°C; 2' / kb
1x	72°C; 5'	72°C; 10'

Für die automatische Sequenzierung von DNA mit einem ABI Prism 310 Sequenzer (Perkin Elmer, Weiterstadt) wurden die Plasmidtemplate nach Angaben des Herstellers mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Nukleotiden amplifiziert. Die Produkte wurden durch Ethanol/NaOAc aus der Reaktionslösung ausgefällt, mit 70% Ethanol gereinigt und dann zur Sequenzierung eingesetzt. Oligonukleotide als Primer wurden von der Mikrochemischen Einheit des IMT synthetisiert. Oligos wurden durch 4-5 malige Extraktion in sek.-Butanol von Schutzgruppen und anderen organischen Kontaminationen befreit und dann mit Ethanol/NaOAc gefällt.

3.2.2.9 Detektion von Nukleinsäuren durch Northern und Southern Blot

Northern und Southern Blot wurden nach Standardprotokollen durchgeführt [131], die Nukleinsäuren wurden jeweils auf Nylonmembran übertragen. Für den Southern Blot erfolgte vor der Gelelektrophorese ein Restriktionsverdau genomischer Hefe-DNA, so daß z.B. die Integration eines bestimmten DNA-Konstruktes oder die Zerstörung eines Genes eindeutig analysiert werden kann. Northern Blot wurde z.B. zur Analyse der snRNAs in einem Immunpräzipitat eingesetzt. Nach erfolgtem Transfer wurden die Nukleinsäuren durch UV-Bestrahlung für 3 min bei 302 nm kovalent mit der Nylonmembran vernetzt. Die Detektion erfolgte jeweils über radioaktiv markierte DNA-Sonden, die durch Random-Primer Labeling hergestellt wurden (siehe 3.2.2.9.1). Zuvor wurde die Membran mit sonifizierter Lachsspermien-DNA unspezifisch blockiert (in Prähybridisierungslösung; 42°C, 2h). Anschließend erfolgte die Inkubation in Hybridisierungslösung mit den DNA-Sonden (je 20x10⁶ cpm; über Nacht, 42°C). Waschen der Membran erfolgte nach [131].

Prä-/Hybridisierungslösung:	25 mM	Natriumphosphat, pH 6.5
	6x	SSC
	5x	Denhardts Lösung
	10 % (w/v)	SDS
	50 % (v/v)	Formamid
	0.004 % (w/v)	DNA
	100 µg/ml	sonifizierte Lachsspermien-DNA, hitzedenaturiert
	(Hybridisierungslösung beinhaltet DNA-Sonden: je 20x10 ⁶ cpm pro Sonde)	
20x SSC:	300 mM	Natriumcitrat
	3 M	Natriumchlorid
100x Denhardts Lösung:	2 % (w/v)	BSA
	2 % (w/v)	Polyvinylpyrrolidon
	2 % (w/v)	Ficoll 400
	Filtrieren durch 1.2 µ Filter	

3.2.2.9.1 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Radioaktiv markierte DNA-Sonden zur Detektion komplementärer RNAs im Northern oder DNAs im Southern Blot wurden mit der Random Primer labeling Methode (Stratagene PRIME IT Kit) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Die entsprechenden DNA-Templates wurden zunächst durch PCR-Klonierung der kodierenden Regionen der Hefe-UsnRNA-Gene in Plasmide gebracht und diese in Bakterien amplifiziert (Plasmide pUC18 T7 U1, U2, U4, U5 und U6 für die Hefe U1, U2, U4, U5 und U6 snRNA Gene, sowie Plasmide pRS306-*NAM8* gen und pRS316-*SNU71* gen für *NAM8* und *SNU71*). Aus den isolierten Plasmiden wurde dann das jeweilige DNA-Templat durch entsprechende Restriktionsenzyme herausgeschnitten, die DNA-Bande wurde aus einem Agarosegel isoliert und auf 50 ng/μl verdünnt. Entsprechend wurde mit den Zielgenen verfahren, die durch Southern Blot analysiert wurden (z.B. *NAM8* oder *SNU71*). Die Template wurden dann mit Nonamer-Primern (aus dem PRIME IT Kit) zufälliger Sequenz hybridisiert, die rein statistisch in jeder DNA-Sequenz Komplementarität vorfinden. Diese Primer wurden dann mit Klenow-Enzym unter Verwendung von [α - 32 P]dATP radioaktiv markiert. Es werden im Mittel Sonden von ca. 400 bp Länge gebildet. Die markierten Sonden wurden durch Zentrifugation auf ProbeQuant G50 Mikro-Gelfiltrationssäulchen (Amersham Pharmacia) von freien Nukleotiden getrennt. Typischerweise wurden so aus 50 ng Templat 20-40x10⁶ cpm markierte Sonden erhalten.

3.2.2.10 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* ("run-off") Transkription [131] dient zur Herstellung von RNA-Transkripten aus DNA-Templaten mit T7, T3 oder Sp6 RNA-Polymerasen (je nach dem Promotor, unter den die Templat-Sequenz in das entsprechende Plasmid hineinkloniert wurde). Die Templat-DNA wird vorher durch Restriktionsverdau linearisiert bzw. an der gewünschten Endposition geschnitten, so daß die Transkription aufhört, wenn die Polymerase am Templatende angelangt ist. RNAs können so auch radioaktiv markiert oder mit modifizierten Nukleotiden (z.B. biotinyliertem UTP) versehen werden. Für die Gewinnung radioaktiv markierter RNA wurden kleine Reaktionsansätze aus den unten genannten Komponenten verwendet. Die Reaktion erfolgte für 2h bei 37°C. Um größere Mengen (30-50 μg) zu erhalten wurde ein Kit (RIBOMAX, Promega) verwendet und nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Die Transkripte wurden zur Reinigung auf denaturierenden Harnstoffgelen von freien Nukleotiden usw. abgetrennt (siehe 3.2.2.4). Die entsprechende RNA-Bande wurde im Gel entweder durch Autoradiographie oder UV-Shadowing visualisiert, ausgeschnitten, das Gelstück wurde zerkleinert und in RNA-Elutionspuffer über Nacht bei 4°C aus dem Gel eluiert. Anschließend wurden die RNAs in Ethanol/NaOAc ausgefällt, gewaschen, ihre Konzentration oder spezifische Aktivität bestimmt und entsprechend der weiteren Verwendung verdünnt.

	unmodifizierte RNA	radioaktiv markierte RNA	biotinylierte RNA
linearisiertes Plasmid-Templat (40 nM)	15,0 μl		
linearisiertes Plasmid-Templat (0,5μg/μl)		2,0 μl	10,0 μl
5x T7 Puffer	20,0 μl		20,0 μl
10x Transkriptionspuffer (enthält DTT)		1,0 μl	
100 mM DTT	10,0 μl		10,0 μl
100 mM MgCl ₂	9,6 μl		9,6 μl
10xNTPs (je 25 mM ATP, GTP, CTP, UTP)	10,0 μl		10,0 μl
10x NTPs (je 5mM ATP, GTP, CTP; 1 mM UTP)		1,0 μl	
Biotin-16 UTP (1,25 mM)			10,0 μl
T7 oder Sp6 RNA Polymerase (20 U/μl)	15,0 μl	1,0 μl	10,0 μl
RNasin, 40 U/μl	4,0 μl	0,5 μl	4,0 μl
[α - 32 P] UTP, 3000 Ci/mmol		2,5 -4,5 μl (je nach gewünschter spez. Aktivität)	
dd Wasser	21,4 μl	0 - 2,0 μl	16,4 μl

5x T7 RNA Polymerase Puffer:	200 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	30 mM	MgCl ₂
	10 mM	Spermidin
Elutionspuffer RNAs:	500 mM	NaOAc (pH 5,0)
	1 mM	EDTA
	2.5 % (v/v)	1:1 Phenol / Chloroform

3.2.2.11 Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden am 5'- Ende

DNA-Oligonukleotide, die z.B. als Primer für eine Reverse Transkriptase Reaktion dienen sollten (siehe 3.2.5.2), wurden durch T4-Polynukleotidkinase unter Verwendung von [γ -³²P]-ATP am 5' -Ende phosphoryliert und somit radioaktiv markiert [136]. Dazu wird das Oligo zunächst durch Gelelektrophorese gereinigt und dann auf 20 ng/ μ l verdünnt. 1 μ l der Oligolösung werden 2,5 μ l 10xPNK Puffer, 5 μ l [γ -³²P]-ATP (5000 Ci/mmol), 1 μ l PNK (x U/ μ l) und 15,5 H₂O versetzt und für 1h bei 37°C inkubiert. Das Volumen wird anschließend mit 25 μ l STE-Puffer (100 mM NaCl; 20 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10 mM EDTA) versetzt und über G50-Säulen (ProbeQuant G50 Columns; Pharmacia; siehe auch 3.2.2.9.1) gereinigt.

3.2.2.12 Überexpression von Fusions-Proteinen in Bakterien

Hefe-snRNP Proteine wurden als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase am N-Terminus exprimiert. Dazu wurde das GST-Expressionssystem der Firma Pharmacia verwendet und nach den Arbeitsprotokollen des Herstellers vorgegangen. Die entsprechenden kodierenden Sequenzen wurden durch PCR aus genomischer Hefe-DNA amplifiziert und in den pGEX-4T1 Vektor kloniert. Dieser kodiert für GST unter dem in Bakterien induzierbaren Lac-Promotor, der durch Isopropyl-Thiogalaktosid (IPTG) im Wachstumsmedium aktiviert wird. Stromabwärts der GST-Sequenz befindet sich eine Multi-Cloning-Site (MCS), in die der gewünschte Offene Leserahmen kloniert werden kann. Dieser wurde stets mit seinem eigenen Stopcodon in den Vektor kloniert, jedoch enthält der pGEX-4T1 Vektor stromabwärts der MCS Stopcodons in allen drei Leserastern. Die ligierten Vektoren wurden zunächst in den *E.coli* Stamm HB101 transformiert, amplifiziert und die Sequenz des Inserts durch automatische DNA-Sequenzierung verifiziert. Anschließend wurden die Expressionsvektoren in den *E.coli* Stamm BL-21 pLys transformiert, da diese Zellen effizienter lysiert werden können als HB101. Die Expression des Fusionsproteins wurde standardisiert bei einer OD₆₀₀ der Zellen von 0,7 durch Zugabe von 1 mM IPTG zum Wachstumsmedium bei 30°C induziert. Gegebenenfalls wurden optimale Bedingungen für die maximale Expression löslicher Proteine durch Variation der Temperatur und/oder der Mengen an IPTG ermittelt. Dazu wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Induktion Proben genommen und die Expression sowie die Löslichkeit des Proteins wurde durch SDS-PAGE-Analyse des Gesamt-Proteingehaltes der Zellen oder durch separate Analyse von Zell-Lysat und festen Zellbestandteilen (auch jeweils durch SDS-PAGE) verfolgt. Die Fusionsproteine wurden aus Zell-Lysat (durch Sonifizierung des Zellpellets in Gegenwart von DNase I) durch Chromatographie an Glutathion-Sepharose, nach Angaben des Herstellers (evtl. unter Zugabe von Detergens und Salz zum Lysat und zum PBS-Waschpuffer) aufgereinigt. Die Elution erfolgt durch Überleiten einer 10-20 mM Lösung an reduziertem Glutathion im Waschpuffer. Die Proteine wurden anschließend gegen Puffer D dialysiert, um Glutathion zu entfernen und die gewünschte Salzkonzentration einzustellen.

PBS-Puffer:	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄ (pH 7,3)
	140 mM	NaCl
	2,7 - 700 mM	KCl
	1 % (v/v)	Triton X-100
	0,5 mM	DTT
	0,5 mM	PMSF
Puffer D:	20 mM	HEPES-KOH (pH 7,9)
	150 - 300 mM	KCl
	8% (v/v)	Glyzerin
	0,5 mM	DTT
	0,5 mM	PMSF

3.2.3 Immunologische Methoden

3.2.3.1 Immunisierung von Kaninchen

Insgesamt wurden fünf Kaninchen mit GST-Fusionsproteinen immunisiert (Snu17p, Nam8_{ΔC-term}p, Snu56p, Npl3p und Aar2p). Jeweils 500 μg des Antigens wurden in Specol (ohne Freundsches Adjuvans) emulgiert (Gesamtvolumen 500 μl) und in ca. 5 Portionen an verschiedene Stellen subkutan injiziert. Die Immunisierung wurde alle drei Wochen wiederholt. Je ca. 50 ml Blut wurde anfänglich alle drei Wochen, nach der vierten Immunisierung wöchentlich abgenommen. Das Blut wurde zur Gerinnung über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und das Serum durch zweimaliges Zentrifugieren für 10 min bei 2500 U/min von Gerinnseln gereinigt. Die Antiseren wurden durch Western Blot-Analyse auf ihre Spezifität und Empfindlichkeit getestet, sowie für Immunpräzipitationen eingesetzt. Die Seren ergaben in einer Verdünnung von 1:5000 spezifische Signale mit nur geringem oder ohne jeglichen Hintergrund im Western Blot von isolierten U1 snRNP-Proteinen.

3.2.3.2 Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper

Polyklonale Antikörper (IgG), z.B. aus Prä-Immunsrum oder Serum gegen Aar2p, wurden nach [131] über Protein A Sepharose isoliert. Die maximale Proteinkonzentration der Eluate betrug 2,6 μg/μl (der Puffer enthielt 90 mM Glyzin, 100 mM Tris/HCl; pH 8,0).

3.2.3.3 Immunpräzipitation

Durch Immunpräzipitation [131] wurde zumeist die Assoziation eines bestimmten Proteins mit snRNPs untersucht, aber auch seine Assoziation mit dem aktiven Spleißosom. Zunächst wurden die Antikörper an Protein A Sepharose gekoppelt und die übrigen Bestandteile des Serums gewaschen. Dann wurde die IgG-gekoppelte Protein A Sepharose mit z.B. Hefe-Gesamtzellextrakt oder aber einer *in vitro* Spleißreaktionsmischung mit radioaktiv markierter prä-mRNA inkubiert, schließlich sedimentiert und mehrmals gewaschen. Im ersteren Fall wurden die kopräzipitierten snRNAs aus dem Immunpräzipitat extrahiert und, nach Gelelektrophorese, durch Northern Blot analysiert. Werden hierbei im letzten Waschschritt ansteigende Salzkonzentrationen benutzt, so läßt sich die Stabilität der Assoziation des Proteins mit dem entsprechenden snRNP abschätzen. Im zweiten Fall werden die radioaktiv markierten prä-mRNAs und Spleißprodukte aus dem Präzipitat extrahiert und, nach denaturierender Harnstoff-Gelelektrophorese, durch Autoradiographie analysiert. Ist das entsprechende Protein stabil mit dem Spleißosom oder anderen spleißosomalen Komplexen assoziiert und für die Antikörper zugänglich, so beobachtet man eine Kopräzipitation von prä-mRNA und Spleißprodukten.

Alternativ wurden *in vivo* mit Protein A Tag fusionierte und exprimierte Proteine durch Inkubation mit IgG-Agarose aus Extrakten präzipitiert. Hierbei werden die unspezifischen Antikörper, die kovalent mit der Agarose vernetzt sind, durch die Protein A Tags an dem entsprechenden Protein gebunden. Die Analyse der kopräzipitierten snRNAs oder Spleißprodukte erfolgt wie oben beschrieben.

Durchführung: Je nach Güte des Serums wurden 2-10 µl Antiserum mit 20 µl Protein A Sepharose in einem Volumen von 300 µl Puffer NET-2 150 gekoppelt (die Sepharose war vorher in diesem Puffer gewaschen und äquilibriert worden). Nach 1,5 h Rotation bei 4°C wurde die Sepharose kurz abzentrifugiert und dann drei mal mit 1 ml Puffer NET-2 150 gewaschen. Anschließend wurden 20 - 50 µl Hefeextrakt oder eine Spleißreaktionsmischung, die 20 µl Extrakt enthielt, in einem Volumen von 500 µl NET-2 150 für 1,5 - 2 h bei 4°C rotiert, anschließend wurde wieder drei mal mit 1 ml Puffer gewaschen, wobei hier NET-2 unterschiedlicher Salzkonzentrationen benutzt wurden (bei der Präzipitation von Spleißreaktionsmischungen 150 mM NaCl). Für Protein A Tag Fusionsproteine wurden 50 µl Extrakt mit 20 µl (gewaschener) IgG-Agarose in Puffer NET-2 150, wie oben beschrieben, präzipitiert und dann gewaschen. Die Immunpräzipitate (ca. 30 µl Volumen) wurden nach dem letzten Waschschrift mit 1,5 µl Proteinase K Lösung versetzt und bei 37°C für 15 min. inkubiert, um die snRNAs oder Spleißprodukte effizient von Proteinen zu befreien. Anschließend wurden 200 µl Stop-Splicing Puffer und 200 µl PCA hinzugegeben, die RNAs extrahiert (siehe 3.2.1.2), aus der wäßrigen Phase durch Ethanol-Präzipitation gewonnen und auf denaturierenden Harnstoffgelen (8% Acrylamid) aufgetrennt.

Puffer NET-2:	50 mM 0,05 % (v/v) 150-700 mM	Tris-HCl (pH 7,5) Nonidet-P 40 NaCl
Proteinase K Lösung:	1 µg/µl 50 mM 1 % (w/v)	Proteinase K EDTA SDS
Stop-Splicing Puffer:	50 mM 0,27 mM 0,1 % (w/v) 16,7 µg/ml	NaOAc (pH 5,3) EDTA SDS <i>E.coli</i> tRNA (durch mehrfache PCA-Extraktion gereinigt)

3.2.4 Zellkultur

3.2.4.1 Kultur von Bakterienzellen

Bakterien (*E.coli* Stämme HB101 und BL-21) wurden nach [131] in LB-Medium, zumeist in Gegenwart von 100 µg/ml Ampicillin kultiviert. Auf Agarplatten wurde das gleiche Medium verwendet, enthielt jedoch 1,5 % Bacto-Agar. Für Glyzerinkulturen zur Langzeitlagerung von transformierten Zellen wurden 400 µl einer Flüssigkultur mit 200 µl sterilisiertem, 50 % (w/v) Glycerin versetzt, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

LB-Medium:	1 % (w/v) 0,5 % (w/v) 1 % (w/v) 1,5% (w/v)	Bacto-Trypton Hefe-Extrakt Natriumchlorid Bacto-Agar (optional, nur für Plattenmedium)
------------	---	---

3.2.4.2 Kultur von Hefezellen

Für die Suspensionskultur wurden die entsprechenden Medien autoklaviert (Plattenmedium enthielt zusätzlich Agar) auf 65°C abgekühlt und mit sterilen Zuckerlösungen versetzt. Für Agarplatten wurde das Medium im flüssigen Zustand an einer sterilen Arbeitsbank (clean bench) auf etwa 5 mm Höhe in Petrischalen gegossen. Hefezellen wurden mit einer ausgeglühten Platinöse von einer anderen Plattenkultur oder aus einer Glycerinkultur auf die neue Platte übertragen und gleichmäßig verstrichen. Die neue Kultur wächst bei 30°C für 2 Tage, anschließend wird sie mit Parafilm luftdicht verschlossen und dann bei 4°C aufbewahrt. Für Suspensionskulturen wurden von einer Platte zunächst kleine Volumina angeimpft (5-200 ml Medium) und über Nacht bei 250 U/min und 30°C geschüttelt. Anschließend wurden große Kulturen (je 1l in 2l-Erlenmeyerkolben) mit einer definierten Menge an Zellen aus der Vorkultur (10 OD₆₀₀ pro Liter) angeimpft. Verschiedene Kulturmedien wurden je nach Zweck angesetzt. Für normale Stämme YPD-Medium, zur Expression von Genen, die unter dem *GAL1* Promotor stehen YPG-Medium, zur Selektion nach bestimmten Genmarkern wurde synthetisch depletiertes (SD) Medium verwendet. Dieses enthält alle essentiellen Aminosäuren, bzw. Nukleotidvorstufen außer derjenigen, für die der entsprechende Hefestamm aufgrund des Genmarkers auxotroph ist (z.B. Leucin, Tryptophan, Uracil). Alle Medien wurden mit 2% (w/v) Zucker angesetzt. Für die Sporulation diploider Hefezellen wurde Sporulations-Medium (SPO-Agar) eingesetzt. Für Glycerinkulturen zur Langzeitaufbewahrung rekombinanter Stämme bei -80°C wurden gleiche Volumina Zellkulturlösung mit 87%igem, sterilem Glycerin versetzt und dann in flüssigem N₂ schockgefroren.

YPD/G-Medium:	2 % (w/v)	Bacto-Pepton
	1 % (w/v)	Bacto-Hefeextrakt
	2 % (w/v)	Glukose (<u>D</u> extrose) oder <u>G</u> alaktose (sterilfiltriert)
	2 % (w/v)	Bacto-Agar (für Agarplatten)
SD-Medium:	0,67% (w/v)	Stickstoff-Base mit Ammoniumsulfat
	100 ml/l	10x Aminosäure Stammlösung (sterilfiltriert)
	2 % (w/v)	Glukose oder Galaktose (sterilfiltriert)
	2 % (w/v)	Bacto-Agar (für Agarplatten)

10x Aminosäure Stammlösung: 0,1 g/l Adenin; 0,1 g/l Uracil (kein Uracil für *URA3*⁺-Stämme); 0,1 g/l Tryptophan (kein Tryptophan für *TRP1*⁺-Stämme); 0,1 g/l Histidin (kein Histidin für *HIS3*⁺-Stämme); 0,1 g/l Arginin, 0,1 g/l Methionin, 0,15 g/l Tyrosin; 0,15 g/l Leucin (kein Leucin für *LEU2*⁺-Stämme); 0,15 g/l Isoleucin; 0,15 g/l Lysin; 0,25 g/l Phenylalanin; 0,5 g/l Glutaminsäure; 0,5 g/l Asparaginsäure; 0,7 g/l Valin; 1,0 g/l Threonin; 2,0 g/l Serin. Die Lösung wird sterilfiltriert und erst ins autoklavierte und abgekühlte Medium gegeben.

SPO-Agar:	1,5 % (w/v)	KOAc
	0,2 % (w/v)	Bacto-Hefeextrakt
	2 % (w/v)	Bacto-Agar
	0,1 % (w/v)	Glukose (sterilfiltriert, ins abgekühlte Medium geben)
	50 ml/l	HALLUT-Lösung (sterilfiltriert, ins abgekühlte Medium geben)

HALLUT-Lösung: Je 1,0 g/l Histidin, Adenin, Leucin, Lysin, Uracil und Tryptophan.

3.2.5 Spezielle Methoden zur Analyse von Hefe-UsnRNPs und deren Proteinen

3.2.5.1 Hefegenetik

3.2.5.1.1 Transformation von Hefezellen

Hefezellen wurden nach der LiOAc-Methode kompetent gemacht und je nach Anwendung mit 100-200 ng Plasmid oder 1-5 µg linearisierter DNA transformiert [137]. Als carrier DNA wurde sonifizierte und PCA-extrahierte Lachsspermien-DNA verwendet (ca. 40-60 µg pro Ansatz). Die Zellen wurden anschließend auf den entsprechenden Selektionsmedien ausplattiert.

3.2.5.1.2 Gen-Deletion durch homologe Rekombination

Gen-Deletionen wurden durch Transformation mit DNA-Konstrukten durch homologe Rekombination erreicht [138]. Dazu wurde zunächst das entsprechende Gen inklusive seiner flankierenden Regionen mit spezifischen Oligonukleotidprimern aus genomischer Hefe-DNA amplifiziert (für *NAM8* Oligos 31 und 32, für *SNU71* Oligos 19 und 20; für *AAR2* Oligos 49 und 50). Diese wurden in Plasmide der pRS-Familie kloniert (z.B.: pRS316 [127]: Ein Shuttlevektor, der sowohl in Hefe als auch in Bakterien repliziert wird; enthält eine MCS, eine ARS Sequenz - autonomously replication sequence -, eine Zentromerregion (CEN), ein Ampicillinresistenzgen und den *URA3*-Genmarker). Aus dem Zielgen wurde dann mit geeigneten Restriktionsenzymen ein möglichst großes Stück der kodierenden Region herausgeschnitten und dann ein Markergen hineinkloniert (dieses Markergen wird jeweils mit Oligos, die die gleichen Restriktionsschnittstellen enthalten, durch PCR aus Plasmiden der pRS-Klasse amplifiziert). Aus den resultierenden Plasmiden wurde das nun durch das Markergen zerstörte Zielgen mit den ursprünglichen Restriktionsenzymen herausgeschnitten und das lineare DNA-Konstrukt in einen diploiden Hefestamm (z.B. TR1a/α) transformiert. Transformanten wurden auf den entsprechenden Selektionsmedien isoliert.

3.2.5.1.3 PCR-basierte Gen-Deletions-Strategie

Das DNA-Konstrukt zur Deletion eines Gens durch homologe Rekombination (siehe 3.2.5.1.2) kann auch ausschließlich durch PCR gewonnen werden (ohne Klonierung in ein Plasmid). Dazu werden drei PCR-Produkte benötigt: Die 5' - und die 3' -UTRs des gewünschten Gens werden separat amplifiziert (für *SNU17*: Oligos 96 & 97 sowie 98 & 99); als drittes Produkt wird das Markergen mit Primern so amplifiziert, daß dieses jeweils mit dem 3' -Ende des 5' -UTR-Produktes und dem 5' -Ende des 3' -UTR-Produktes basenpaaren kann (hier *HIS3*, wurde mit Oligos 3 und 4 aus Plasmid pRS316/114delXbaEcoN+*HIS* amplifiziert). Die drei gewonnenen PCR-Produkte werden in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Schritten miteinander verknüpft. Zuerst wird das 5' -UTR-Produkt mit dem *HIS3*-Produkt gemischt und dient als Templat für eine Amplifikation mit Oligos 96 und 4. Das entstandene Produkt (5' -UTR~~*HIS3*~~) wird mit dem 3' -UTR Produkt gemischt und dient im letzten Schritt als Templat für eine Amplifikation mit Oligos 96 und 99. Es resultiert das gewünschte Produkt 5' -UTR~~*HIS3*~~-3' UTR, das direkt in einen diploiden Stamm transformiert wird. Positive Transformanten werden auf SD-Medium ohne Histidin selektioniert. Der Stamm wurde sporuliert und solche Tetraden, die *HIS*⁺ waren, wurden selektioniert. Im Falle von *SNU17* war die Deletion nicht letal, sondern erzeugte nur einen hitzesensitiven Wachstumsphänotyp (siehe 3.2.5.1.6).

3.2.5.1.4 Isolierung von genomischer DNA aus Hefe

Genomische DNA aus Hefe wurde nach der Vorschrift von [139] isoliert. Aus 7 ml Hefekultur werden so ca. 120 µg genomische DNA gewonnen. Diese kann dann für Southern Blot Analysen oder als Templat für PCR-Reaktionen eingesetzt werden, um z.B. die korrekte Integration eines bestimmten DNA-Konstruktes zu verifizieren.

3.2.5.1.5 Sporulation und Tetradenanalyse (nach [140])

Um einen haploiden Hefestamm zu isolieren und z.B. die Letalität einer Gen-Deletion nachzuweisen, müssen die Zellen zunächst sporuliert und dann die vier aus der Meiose resultierenden Sporen vereinzelt werden. Sporulation findet auf SPO-Agar Medium statt. Nach 3-5 Tagen haben ausreichend viele Zellen Tetraden gebildet, so daß man die Sporen mit Hilfe des Dissektionsmikroskopes vereinzeln kann. Zunächst werden die Tetraden kurz mit Zymolyase behandelt, um den Ascus anschließend leichter mechanisch aufbrechen zu können. Dazu wird eine stecknadelkopfgröße Menge an Zellen von der Sporulationsplatte in 50 µl einer Lösung von 0,5 mg/ml Zymolyase-100T in 1 M Sorbitol suspendiert und für 3 min bei RT inkubiert. Anschließend läßt man vorsichtig 800 µl steriles Wasser in das Gefäß tropfen und durchmischt die Suspension vorsichtig. Von dieser Suspension werden 25 µl an den Rand einer YPD- oder YPG-Platte getropft und auf der schräg gehaltenen Platte, entlang einer markierten Linie im oberen Viertel der Platte, laufen gelassen. Die überschüssige Lösung wird vom gegenüberliegenden Plattenrand wieder abpipettiert. Die Flüssigkeit wird zunächst trocknen gelassen, dann spannt man die Platte auf dem Manipulationstisch des Mikroskopes ein. Mit einer sehr dünnen Glasnadel werden nun einzelne Tetraden aus der "Zell-Spur" aufgenommen, und an einer definierten Stelle der Platte wieder abgelegt. Durch leichte Erschütterung der Nadel wird der Ascus aufgebrochen. Die vier Sporen werden dann einzeln aufgenommen und an definierten Stellen abgelegt. Dies wird für 12-14 Tetraden wiederholt und die Platte dann bei 25°C inkubiert. Nach 2-4 Tagen kann man dann analysieren, ob jeweils alle vier oder nur zwei Sporen wachsen, im letzteren Fall ist vermutlich das (nur auf einem Chromosom) zerstörte Gen für die Letalität der beiden Sporen verantwortlich. Dies wird durch mehrere Experimente überprüft. Zunächst wird eine Replik dieser Platte auf SD-Medium angelegt, so daß nach dem integrierten Markergen selektioniert wird. Wachsen hier keine Sporen, so ist klar, daß die Zellen, welche das integrierte Markergenkonstrukt enthalten, aufgrund der Gendeletion nicht wachsen können. Zusätzlich wird der diploide, auf einem Schwester-Chromosom Gen-deletierte Stamm mit einem Plasmid transformiert, welches das hier untersuchte Wildtyp-Gen und ein Markergen enthält, das nicht mit dem zur Deletion benutzten identisch ist. Dieser transformierte Stamm wird wiederum sporuliert und die Tetraden werden analysiert. Findet man nun wieder vier überlebende Sporen, sowie eine Kosegregation der beiden genetischen Marker, so ist sicher nachgewiesen, daß die Letalität von der Zerstörung des einen Gens verursacht wird.

3.2.5.1.6 Testen von temperatur-sensitiven Wachstumsphänotypen

Findet sich nach Tetradenanalyse keine Letalität des deletierten Stammes, so kann man testen, ob die Deletion des Gens möglicherweise einen temperatursensitiven Wachstumsphänotyp erzeugt. Durch Replika-Plattierung wird zunächst ein haploider Stamm mit der Gendeletion isoliert. Anschließend wird eine kleine Menge der Zellen in 100 µl sterilem Wasser suspendiert und eine Verdünnungsreihe dieser Suspension, jeweils im Verhältnis 1:10, in eine 96-Kammern Mikrotiterplatte pipettiert. Diese verdünnten Suspensionen werden mit einem Stempel, der 8x4 Metallzapfen hat, parallel auf mehrere YPD-Platten übertragen. Zur Kontrolle wird mit Wildtyp-Zellen genauso verfahren. Die Platten werden dann bei verschiedenen Temperaturen (17°C, 25°C, 30°C, 37°C) inkubiert und die Wachstumsraten der Wildtyp-Zellen mit den Gen-deletierten Zellen verglichen.

3.2.5.1.7 Positionierung von Genen unter die Kontrolle des *GALI* Promotors

Die Funktion einzelner Gene und derer Produkte kann durch Regulation ihrer Expression analysiert werden. Dazu kann man das Gen unter die Kontrolle des induzierbaren *GALI*-Promotors stellen, der in Anwesenheit von Glukose im Wachstumsmedium reprimiert,

durch Galaktose jedoch aktiviert wird [141]. Ein entsprechendes Genkonstrukt kann durch PCR-Klonierung in einem Plasmid erzeugt werden. Dies wurde z.B. für *AAR2* getan: Es wurde ein Plasmid benutzt (pRS-314-*GAL1*; freundlicherweise von P.Fabrizio zur Verfügung gestellt), das den *GAL1*-Promotor mit einer stromabwärts gelegenen MCS sowie ein Markergen enthielt. Die kodierende Sequenz von *AAR2* wurde durch PCR mit den Oligos 51 und 53 amplifiziert. Durch Oligo 53 wurden noch zehn für Histidin kodierende Triplets ans 3' -Ende von *AAR2* angehängt. Dieses Konstrukt wurde in pRS-314-*GAL1* kloniert und dieses Plasmid wurde wiederum in den diploiden Hefestamm AGY5 transformiert, dessen eine chromosomale Kopie von *AAR2* durch *URA3* zerstört worden war. Nach Sporulierung wurde ein haploider Stamm isoliert (AGY8), der *AAR2* nur in Anwesenheit von Galaktose unter der Kontrolle des *GAL1* Promotors von pRS314-*GAL1::AAR2-10xHis C-Term* exprimiert.

Alternativ kann man auch ein Konstrukt, welches das *HIS3*-Markergen und den *GAL1*-Promotor enthält, direkt vor das Startcodon des gewünschten Genes integrieren. Dazu stand ein *HIS3/GAL1*-Konstrukt auf einem Plasmid zur Verfügung (freundliche Gabe von Martin Funk). Diese Methode wurde für *SPP381* und *SNU23* angewendet. Durch PCR mit langen Oligonukleotiden, die jeweils 45 nt komplementäre Sequenzen zur 5' -UTR der Gene und zu den ersten 45 nt der kodierenden Sequenz (inklusive des Startcodons) enthielten, wurden *HIS3/GAL1*-Konstrukte mit Komplementarität zum 5' -Ende der beiden Gene erzeugt. Diese wurden direkt in einen haploiden Stamm transformiert (YPH499), dessen chromosomales *HIS3*-Gen komplett entfernt wurde, so daß keine falsche Integration am *HIS3*-Lokus stattfinden kann. Transformanten wurden dann auf SD-Platten ohne Histidin selektioniert.

Um nun den Effekt der Repression der entsprechenden Gene zu studieren, wurden die Zellen zunächst in YPG-Medium kultiviert, dann wurde eine definierte Menge von Zellen zunächst gewaschen, um die Galaktose zu entfernen, und schließlich je zwei neue YP-Suspensionskulturen angeimpft, von denen die eine Galaktose, die andere Glukose enthielt. Alle vier Stunden wurde die OD₆₀₀ gemessen und je 1 OD₆₀₀ an Zellen abgenommen. Die Kulturen wurden jeweils so verdünnt, daß ihre OD₆₀₀ zwischen 0,2 und 0,6 lag, um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten. Die Wachstumsraten der Galaktose- (Expression) und Glukosekulturen (Repression) wurden verglichen. Bei essentiellen Genen sollte die Repression zum Stop des Wachstums und zum Zelltod führen. Allerdings läßt sich der *GAL1* Promotor nicht vollständig abschalten, so daß man eine geringe Hintergrundexpression erwarten kann, die bei stabilen Proteinen womöglich ausreicht, deren essentielle Funktion in ausreichendem Maße aufrecht zu erhalten.

3.2.5.1.8 *In vivo* Fusionierung von Hefeproteinen mit der IgG-Bindungsdomäne des bakteriellen Protein A am C-Terminus

Das bakterielle Protein A aus *Staphylococcus aureus* bindet sehr spezifisch und stabil die Fc-Region von IgG Antikörpern. Die IgG-bindende Domäne selbst ist ca. 7,5 kDa groß und kann *in vivo* an Proteine fusionisiert werden, um einen Affinitätstag an dem Protein anzubringen, der dann selbständig an IgG-Agarose (oder freie IgGs) binden kann. Die Proteine Rse1p, Snu66p, Spp381p, Snu23p, Snu17p und Ynr5p wurden dazu nach der Methode von [142] *in vivo* mit einer Tandem-Wiederholung der IgG-Bindungsdomäne fusioniert. Die Methode umfaßt zwei PCR-Schritte, für die jeweils drei verschiedene Primer benötigt werden (Primer "B1", "B2" und "B3"), sowie eine zwischengeschaltete Ligationsreaktion. Ein Konstrukt aus der Tandem-Wiederholung der IgG-bindenden Domäne des Protein A und dem *TRP1*-Markergen lag auf einem Plasmid vor (freundliche Gabe von B. Séraphin). Zunächst wurden durch PCR mit den Primern B1 und B2 jeweils ca. 500 nt aus der 3' -UTR der Zielgene amplifiziert. Das Plasmid wurde stromabwärts des *TRP1*-Gens mit XhoI geschnitten und durch Klenow-Enzym wurde die Schnittstelle zu einem stumpfen Ende aufgefüllt (die geschnittene DNA wird zunächst extrahiert, dann mit Klenow-Enzym und

NTPs versetzt und bei RT für 15 min inkubiert). Dann wurde das B1-B2 PCR-Produkt durch T4-Ligase mit dem linearisierten Plasmid verknüpft. Im zweiten PCR-Schritt wurde dann aus den Ligationenprodukten mit den Primern B3 und B2 amplifiziert (B3 setzt am 5' -Ende des IgG-Bindungsmoduls an und enthält zusätzlich noch 45 nt komplementärer Sequenz zum 3' -Ende der Zielgene, unter Aussparung des Stopcodons). Das entstehende PCR-Produkt enthält von 5' nach 3' : 45 nt Homologie zum 3' -Ende des Zielgens, IgG-Bindungsdomäne *ERP1*-Gen, 500 nt Homologie zur 3' -UTR des Zielgens. Dieses Konstrukt kann direkt in einen haploiden Stamm in die 3' -UTR der Zielgene integriert werden. Insbesondere die 500 nt homologer Sequenz am 3' -Ende des Konstruktes sorgen für eine hohe Integrationsrate an der richtigen Stelle. Die Transformanten werden zunächst durch Selektion auf SD-Platten ohne Tryptophan isoliert. Die Expression des korrekten Fusionsproteins wird durch Western Blot-Analyse von Gesamtzell-Lysat überprüft: Auch nach Denaturierung der Proteine in SDS-Probenpuffer kann die IgG-Bindungsdomäne IgGs binden. Zur ECL-Detektion der Protein A fusionierten Proteine wird ein löslicher Immunkomplex aus Peroxidase und anti-Peroxidase-IgGs verwendet (PAP, Sigma), der eine Sphäre von Peroxidasemolekülen um die Protein A Tags erzeugt. Das korrekte Zielprotein hat sein ursprüngliches Molekulargewicht plus 15 kDa. Anschließend wurden Spleißextrakte aus den entsprechenden Kolonien hergestellt.

3.2.5.2 Detektion von *in vivo* Spleißdefekten durch Primer-Extension von Gesamt-RNA aus Hefe

Potentielle, durch die Depletion eines Spleißfaktors hervorgerufene *in vivo* Spleißdefekte wurden durch Analyse von total-RNA untersucht. Dabei wurde das Verhältnis von ungespleißter prä-mRNA zu reifer mRNA in den depletierten Zellen und in Zellen, die das Protein exprimieren, verglichen. Eine bestimmte intronhaltige RNA (hier stets prä-U3 RNA) wird hierbei als Templat für eine Reverse Transkriptase Reaktion (Primer Extension) mit einem radioaktiv markierten DNA-Primer benutzt, der zum 3' -Exon der prä-U3 RNA (und somit auch zum 3' -Bereich der reifen U3 RNA) komplementär ist (Oligo 102). Die entstandenen DNA-Transkripte werden dann durch denaturierende Harnstoff-PAGE getrennt und ihre relativen Mengen durch Autoradiographie des getrockneten Gels verglichen.

Isolierung von Gesamt-RNA: 1 OD₆₀₀ Hefezellen wird in 400 µl AE-Puffer resuspendiert, mit 40 µl 10% (w/v) SDS versetzt und für 30 " auf dem Vortex gemischt. Dann werden 440 µl Phenol (mit AE-Puffer äquilibriert) zugegeben, für 30 ' ' auf dem Vortex gemischt und schließlich für 4 min auf 65°C erhitzt. Diese Mischung wird dann in Ethanol/Trockeneismischung schockgefroren, danach läßt man die Lösung wieder langsam auftauen und zentrifugiert zur Phasentrennung. Die wäßrige Phase wird mit 440 µl PCA extrahiert (durch mehrmaliges Mischen mit der Hand über einen Zeitraum von 10 min) und die RNA wird schließlich durch Ethanol/NaOAc Fällung präzipitiert, gewaschen (70% Ethanol), in 30 µl Wasser aufgelöst und die Konzentration bestimmt (Ausbeute zwischen 5 und 25 µg RNA)

Primer Extension: Pro Reaktion werden 10 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Oligo 102 wird, wie in 3.2.2.11 beschrieben, radioaktiv markiert, pro Ansatz werden dann 100.000 cpm des markierten Oligos eingesetzt. RNA und Oligo werden mit 10 µl 5xAnnealing-Puffer versetzt und das Gesamtvolumen wird mit Wasser auf 50 µl gebracht. Die Mischung wird zur Denaturierung der RNA für 2 min auf 90°C erhitzt und dann langsam (2-3 min) auf RT abgekühlt. Hierbei hybridisieren die Oligos an die (prä-)U3 RNAs. Schließlich werden 5 µl dNTPs (je 5 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP) und 1 µl AMV Reverse Transkriptase (15 U/µl) zugegeben und die Reaktionsmischungen werden 45 min bei 42,5 °C inkubiert. Anschließend wird 150 µl Stop-Splicing Puffer zugegeben (siehe 3.2.3.3), die Mischung mit 200 µl PCA extrahiert, die Nukleinsäuren werden ausgefällt, gewaschen, auf einem 8% Harnstoffgel aufgetrennt und autoradiographisch analysiert.

AE Puffer:	50 mM	NaOAc (pH 5,3)
	10 mM	EDTA
5xAnnealing Puffer:	250 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	750 mM	KCl
	2,5 mM	EDTA
	5 mM	DTT
	7 mM	MgCl ₂

3.2.5.3 Präparation spleißfähiger Hefe-Gesamtzellextrakte

Spleißextrakte wurden nach der Methode von [143] in einer Abwandlung von [144] (Flüssig-Stickstoff Methode) hergestellt. Die Hefezellen werden zunächst bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 2,5 und 3,5 kultiviert und dann bei 3000 U/min abzentrifugiert. Das Zellpellet wird mit 50 ml eiskaltem Wasser je 2 l Hefe-Kultur, dann mit 50 ml AGK-Puffer je 2 l Hefe-Kultur gewaschen (je nach Anwendung mit verschiedenen Mengen Glycerin und Salz - für Spleißextrakte 10% (v/v) Glycerin und 200 mM KCl, für die Präparation von Hefe-snRNPs 8% (v/v) Glycerin und 100 oder 200 mM KCl). Anschließend wurden die Zellen in einem kleinen Volumen AGK-Puffer suspendiert (10 ml/2 l Kultur für Spleißextrakte, 7,5 ml/2 l Kultur für Extrakte zur snRNP-Präparation), das Gesamtvolumen bestimmt und dann 2 M KCl bis zur gewünschten Endkonzentration (100 oder 200 mM) sowie 1 M DTT und 0,5 M PMSF (je auf 0,5 mM Endkonzentration) zugegeben. Für die snRNP-Präparation wurde noch der Proteaseinhibitor Pepstatin zugegeben (4 µg/ml, Stammlösung (4mg/ml) in DMSO). Die entstehende Zell-"Paste" wird in flüssigen Stickstoff getropft, so daß Kügelchen zwischen 2 und 5 mm Durchmesser entstehen.

Die gefrorenen Zellen werden dann unter flüssigem Stickstoff im Mörser zu einem feinen Mehl zerrieben (ca. 20 min lang). Für Spleißextrakte wurde dies in einem Handmörser, für snRNP-Präparationen in einer motorgetriebenen Mörsermühle (RM100, Firma Retsch, D-42759 Haan) durchgeführt. Das Zellmehl kann bei -80°C gelagert werden.

Zur Extraktpräparation werden die gemahlenen Zellen langsam aufgetaut (ca. 2 h bei RT). Alle nachfolgenden Schritte erfolgen bei 4°C. Die Suspension wird 30 min gerührt, dann werden bei 17.000 U/min im SS34 Rotor für 30 min (Sorvall-Zentrifuge) die festen Zellbestandteile abzentrifugiert. Der Überstand wird nochmals für 1 h bei 37.000 U/min (70-Ti Rotor, Beckman Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Dabei klärt sich der Extrakt und bildet drei "Phasen" aus: Am oberen Ende schwimmen Lipide und Liposomen, am Boden sammeln sich Ribosomen, feine Zelltrümmer und genomische DNA, die mittlere, klare Phase wird zur Weiterverwertung vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Je nach Verwendungszweck wird der Extrakt nun dialysiert (je 2 mal 1,5 h gegen 0,5 l Puffer D je 1 Hefe-Kultur): Bei Spleißextrakten wird Puffer D50 mit 20% (v/v) Glycerin verwendet, bei Extrakten zur snRNP-Isolierung Puffer D100 oder 200 mit 8% (v/v) Glycerin. Die Puffer enthielten jeweils 0,5 mM DTT und PMSF. Nach der Dialyse wurden die Extrakte entweder aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert, oder zur chromatographischen Isolierung der snRNPs verwendet (siehe 3.2.5.6).

AGK-Puffer:	20 mM	HEPES/KOH (pH 7,9)
	1,5 mM	MgCl ₂
	100-200 mM	KCl
	8-10 % (v/v)	Glycerin
	0,5 mM	DTT
	0,5 mM	PMSF
	4 µg/ml	Pepstatin (optional)

Puffer D:	20 mM	Hepes-KOH, pH 7.9
	8 oder 20 % (w/v)	Glyzerin
	50 oder 200 mM	KCl
	0,2 mM	EDTA (NICHT bei Extrakten zur snRNP-Präparation)
	0,5 mM	DTT
	0,5 mM	PMSF

3.2.5.4 *In vitro* prä-mRNA Spleißen

Wurde nach der Methode von [143] durchgeführt. Ein Reaktionsansatz hat ein Volumen von 5 µl: 2 µl Extrakt, 1 µl 5x-Spleißpuffer und 2 µl Wasser oder weitere Zusätze wie z.B. Antikörper (zur Spleißinhibition durch Bindung bestimmter Spleißfaktoren), rekombinante Proteine (zur Komplementation depletierter Extrakte), Oligonukleotide (zum gezielten RNaseH-Verdau bestimmter snRNAs), Glukose (zur vollständigen Depletion von endogenem ATP durch Hexokinase-Reaktion), usw. Die Reaktionsmischungen wurden bei 23°C für 15 min vorinkubiert, dann wurde das Spleißsubstrat, z.B. radioaktiv markierte Aktin-prä-mRNA (10.000 cpm, ca. 1,5 fmol), oder biotinylierte prä-mRNA, zugegeben. Diese war in 0,75 µl 1x-Spleißpuffer gelöst. Die Reaktionen wurden je nach Experiment für 20-40 min bei 23°C (oder auch bei höheren Temperaturen bis 37°C) inkubiert, dann wurden die Reaktionen auf Eis gestoppt, 1,5 µl Proteinase K Puffer zugegeben (siehe 3.2.3.3) und bei 37°C für 15 min die Proteine verdaut. Die Spleißprodukte wurden nach Zugabe von 200 µl Stop-Splicing Puffer (siehe 3.2.3.3) mit 200 µl PCA-Lösung extrahiert, auf 8%, 8M Harnstoffgelen elektrophoretisch getrennt und autoradiographisch analysiert.

5x-Spleißpuffer:	300 mM	$K_{3-x}H_xPO_4$ (pH 7,0)
	15 % (w/v)	PEG 8000
	10 mM	ATP (gegebenenfalls weniger oder kein ATP)
	12,5 mM	$MgCl_2$
	10 mM	Spermidin

$K_{3-x}H_xPO_4$: Eine 600 mM Stammlösung wird durch Titration zweier 600mM Lösungen von K_2HPO_4 und KH_2PO_4 auf pH 7,0 eingestellt.

ATP: Wird eingewogen, mit NaOH auf pH 7,5-8,0 eingestellt, die Konzentration photometrisch bestimmt ($OD_{259}=1$ entspricht einer 814,8 mM Lösung), sterilfiltriert und auf 100 mM verdünnt.

3.2.5.5 Inhibition von Spleißen *in vitro* mit Antikörpern und Komplementation der Spleißaktivität mit rekombinanten Proteinen

Die Spleißreaktion wurde durch Zugabe unspezifischer Antikörper (aus einem Prä-Immunserum aufgereinigt; siehe 3.2.3.2) in Extrakten, die ProtA-fusionierte tri-snRNP-Proteine enthielten (z.B. Snu66-protAp, siehe Kapitel 4.4.7), inhibiert. Diese wurden in verschiedenen Konzentrationen anstelle des Wasservolumens zu den Spleißreaktionen zugegeben. Entsprechend wurde mit rekombinanten Proteinen zur Rekonstitution verfahren (z.B. GST-Snu66p; ebenfalls Kapitel 4.4.7). In den Kontrollreaktionen wurde entsprechend das gleiche Volumen des Puffers zugegeben, in dem die Antikörper oder Proteine gelöst waren.

3.2.5.6 Immunaффinitätschromatographische Aufreinigung von UsnRNPs der Hefe

UsnRNPs wurden durch anti-m₃G-Kappen-Immunaффinitätschromatographie mit dem kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose-4B gekoppelten monoklonalen Antikörper H20 (6 mg Antikörper / ml Matrix) aus Gesamtzellextrakten isoliert.

1,5 ml des Säulenmaterials werden in einer Säule mit 10 mm Durchmesser gepackt, in Puffer D mit 0.02% Natriumazid bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch mit 40 ml Puffer D (100 oder 200 mM KCl), dann mit 15 ml Puffer D inklusive je 0.5 mM DTT und PMSF (siehe

3.2.5.3) gewaschen und äquilibriert (Durchflußrate ca 6.5 ml/h). Der Hefe-Gesamtzell-Extrakt wird nach der Dialyse durch Zentrifugation im SS-34 Rotor (9000 U/min, 10 min, 4°C) von Präzipitaten befreit und dann in ca. 18 h über das Säulenmaterial gepumpt (ca 7.5 ml/h). Anschließend werden mit 10 Säulen-Volumen Puffer D unspezifisch gebundene Substanzen heruntergewaschen (5.5 ml/h). Zur Elution werden 4,5 ml 20 mM m⁷G in Puffer D verwendet. Zuerst läßt man ein Säulen-Volumen einlaufen (2.7 ml/h), dann wird der Fluß für 30 min gestoppt. Es wird mit der m⁷G-Lösung und anschließend mit 5 ml Puffer D weitereluiert. Es wird eine 1 ml Fraktion gesammelt, bevor das UsnRNP Eluat (4,5 ml) am Fraktionssammler ankommt. Zur vollständigen Regeneration der Säule werden ca. 6 Volumina 6M Harnstoff in D200 (8 ml/h) übergeleitet (4 x 2 ml Fraktionen). Zum Entfernen des Harnstoffs und zur Lagerung werden 50 ml D200 mit 0.02 % NaN₃ über die Säule geleitet. Mit 20 µl des UsnRNP-Eluates wird eine Proteinmengenbestimmung durchgeführt (3.2.1.1). Die Ausbeute aus 140 bis 180 g Hefe beträgt 400-600 µg UsnRNP-Proteine.

3.2.5.7 Ni-NTA-Metallaffinitätschromatographie von Hefe Gesamt-snRNPs

UsnRNPs, die ein Polyhistidin-fusioniertes (6-10 Histidine am N- oder C-Terminus) Partikel-spezifisches Protein enthielten (Snp1p beim U1 snRNP, Prp4p oder Snu114p beim [U4/U6.U5] tri-snRNP, Aar2p beim U5 snRNP), wurden durch Ni-NTA-Metallaffinitätschromatographie aus dem Gesamt-snRNP-Eluat der H20-Säule isoliert. Je nach Anwendung wurden zwischen 100 und 300 mM KCl im Waschpuffer D verwendet. Die Elution erfolgt durch Verdrängung der Ni²⁺-koordinierenden Histidine mit Imidazol.

Die Ni-NTA-Agarose (0,5 ml) wurde in sterilem Wasser gewaschen (10 Volumina) und dann mit Puffer D (dieser enthielt nur 10 mM HEPES/KOH und kein EDTA, siehe 3.2.5.3) äquilibriert (5 Volumina). Es wurde eine Säule von ca. 7 mm Durchmesser verwendet. Da das Reduktionspotential von DTT ausreicht, Ni²⁺ zu reduzieren, wurde hier für alle Waschpuffer β-Mercaptoethanol (10 mM) verwendet.

Das Eluat wurde über die Ni-NTA-Agarose geleitet (2 ml/h), mit 8x 1,5 ml Puffer D (10 mM Imidazol) wurden schwach oder unspezifisch gebundene Proteine gewaschen. Zur Elution wurden 8x 1 ml Puffer D mit 50 mM Imidazol verwendet (Flußrate 2 ml/h). Zur Kontrolle wurden dann noch 2 ml 100 mM EDTA übergeleitet. EDTA chelatisiert Ni²⁺ und führt so zur Elution allen verbliebenen Materials, das an die Metallionen gebunden ist.

Imidazol-Stammlösung: 1 M Imidazol-HCl (pH 7,9)

3.2.5.8 Glyzeringradienten-Zentrifugation von UsnRNPs und Gesamtzell-Extrakten der Hefe

Die gereinigten UsnRNPs aus den Ni-NTA-Aufreinigungen wurden durch Sedimentation auf einem 10-30% (w/v) Glyzeringradienten von unspezifisch koisolierten Proteinen befreit. Ebenso wurden die in einem Gesamtextrakt enthaltenen snRNPs anhand ihrer Sedimentationskoeffizienten voneinander getrennt. Zentrifugation bei 29000 U/min für 24 h im SW-40 Rotor führt zu einer Sedimentation von 25S-Komplexen im unteren Drittel des 13 ml Gradientenröhrchens. Die Gradientenlösungen wurden von oben her fraktioniert. Die Sedimentationskoeffizienten der einzelnen Fraktionen wurden durch Analyse von identischen Gradienten von Hefe-Gesamt-RNA, die hauptsächlich die 5S, 5,8S, 18S und 25S rRNAs enthält, ermittelt. Es wurden maximal 2 ml Probenlösung pro Röhrchen aufgetragen, bei Gesamtextrakten wurde vorher durch Verdünnung im entsprechenden Puffer die Glyzerinkonzentration auf 8% (w/v) gebracht. Die Zentrifugation wurde bei 4°C durchgeführt, sollten Komplexe anderer Sedimentationskoeffizienten aufgetrennt werden, so wurden die Zeit und/oder U/min entsprechend angepaßt. Für kleinere Mengen wurde auch eine analytische

Ultrazentrifuge (Beckman TL-100) mit TLS-55 Rotor und 2,4 ml Zentrifugenröhrchen verwendet (z.B. bei 55.000 U/min für 3,5 h sedimentiert 25 S ebenfalls im letzten Drittel).

Die 10 und 30 %igen Gradientenlösungen werden mit DTT, PMSF und Pepstatin versetzt und dann durch einen 0,2 µ Filter sterilfiltriert. Der Gradient wird mit Hilfe eines Gradientenmischers hergestellt. Die fertigen Gradienten werden 1h auf 4°C gekühlt, dann wird von oben eine entsprechende Menge Puffer abgenommen und mit der Probenlösung vorsichtig aufgefüllt, ohne die Phasen zu mischen. Die Röhrchen werden in vorgekühlte Halter eingesetzt und diese mit Deckel (auf ca. 5 mg genau) austariert.

Puffer G:	20 mM	HEPES-KOH, pH 7.9
	0.2 mM	EDTA, pH 8.0
	100-700 mM	KCl
	1.5 mM	MgCl ₂
	10 oder 30 % (w/v)	Glyzerin
	0.5 mM	DTT
	0.5 mM	PMSF

3.2.5.9 Integration von Fusionsproteinen in native snRNPs *in vitro*

Je 50 µg der rekombinanten Fusionsproteine von snRNP-spezifischen Proteinen und GST (z.B. GST-Aar2p, siehe Kapitel 4.6.1) wurden an 20 µl Glutathionsepharose gekoppelt (analog zu der Kopplungsreaktion von Antiseren an Protein A Sepharose, siehe 3.2.3.3) und in Puffer NET-2 150 gewaschen. Die Sepharose wurde dann mit 50 µl Spleißextrakt in 500 µl Gesamtvolumen NET-2 150 inkubiert und nach 2 h Rotation bei 4°C wurde der snRNA-Gehalt des Sepharosepräzipitates, wie in 3.2.3.3 beschrieben, analysiert.

3.2.5.10 Affinitätsreinigung von Spleißosomen auf biotinylierter prä-mRNA (nach [145])

Biotinylierte prä-mRNA wurde hergestellt, wie in 3.2.2.10 beschrieben, und für Spleißreaktionen *in vitro* eingesetzt. Es wurde zuvor überprüft, ob diese RNA gespleißt und zuverlässig durch Streptavidin-Agarose gebunden wird. Dazu wurde die biotinylierte RNA in Gegenwart von radioaktiv markiertem UTP transkribiert. Die RNA wurde wie unmodifizierte RNA gespleißt und konnte mit einer Ausbeute von 80 % mit Streptavidinagarose präzipitiert werden. Um Spleißosomen und insbesondere spleißosomale Proteine in nachweisbaren Mengen über die biotinylierte RNA aufzureinigen zu können, wurden Spleißreaktionen in größerem Maßstab angesetzt. Für 300 µl Extrakt wurden dabei 483 ng biotinylierte Aktin prä-mRNA eingesetzt (entspricht 2,6 pmol). Die Spleißreaktionen wurden für 25 min bei 23°C inkubiert und dann mit je 40 µl Streptavidin-Agarose in 1,5 ml Gesamtvolumen (mit Puffer NET-2 150 aufgefüllt; NET-2: siehe 3.2.3.3) für 1,5 h bei 4°C rotiert/präzipitiert. Die Präzipitate wurden anschließend mit 3 x 1,5 ml Puffer NET-2 150 gewaschen und snRNAs wurden (ohne vorherige Proteinase K Behandlung) durch PCA-Extraktion aus den Präzipitaten gewonnen und durch Northern Blot analysiert. Die kopräzipitierten Proteine wurden durch Western Blot analysiert. Dazu wurde die organische Phase der PCA-Extraktion (die auch die Streptavidin Agarose enthielt) zunächst mit Aceton gefällt, dann wurden die Sedimente gewaschen (70% Ethanol), getrocknet und anschließend komplett in SDS-Proteinprobenpuffer aufgeköcht und in einem 1 mm dicken SDS-Gel (13%ig) mit großen Probenaschen aufgetrennt. Als Kontrolle für unspezifische Bindung von snRNPs an die Streptavidin-Agarose wurden analoge Spleißreaktionen, jedoch mit nicht-biotinylierter Aktin prä-mRNA durchgeführt. Je nach dem analysierten Protein können die Reaktionsansätze auch kleiner gewählt werden. So reichen zum Nachweis des Snu114p Proteins Reaktionsansätze mit 40 µl Extrakt aus.

3.2.5.11 Oligonukleotid-gerichtete Zerstörung von snRNAs durch RNaseH

RNAs können im Hefe-Extrakt gezielt durch RNaseH-Verdau zerstört werden, indem dieser mit einem DNA-Oligonukleotid, das komplementär zur entsprechenden RNA-Sequenz ist, inkubiert wird. RNaseH hydrolysiert spezifisch RNA-Sequenzen, die mit DNA Duplices ausgebildet haben. Der Extrakt wird dazu für 30 min bei 30°C in Gegenwart von 0,8-1,2 mM ATP mit dem spezifischen DNA-Oligonukleotid inkubiert. Es wurden hier Oligos verwendet, die gegen verschiedene UsnRNAs gerichtet waren: U2 - Oligo U2_{Kill} (SRU2) [146]; U6 - Oligo U6_{Kill} (d1) [147]; U4 - zwei Oligos U4_{Kill} I (i) und U4_{Kill} II (o). Diese wurden in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (siehe Kapitel 4.4.6.2). Die Oligonukleotide selbst werden im Laufe der Inkubationszeit durch DNasen im Extrakt ebenfalls abgebaut. Die Zerstörung der RNAs basiert zumeist auf einer Spaltung von freiliegenden RNA-Regionen, die nicht durch Proteine geschützt sind. Dies führt dann zur Destabilisierung der snRNP-Partikel und anschließender völliger Hydrolyse der RNA durch Exonukleasen.

3.2.5.12 UV-induzierte Quervernetzung von Proteinen an prä-mRNA

Spleißosomale Proteine, die in engen Kontakt mit der prä-mRNA treten (durch direkte Bindung z.B. mit einer RNA-Bindungs-Domäne), können durch Bestrahlung mit UV-Licht hoher Energie (254 nm) mit dieser kovalent quervernetzt werden. Die UV-Bestrahlung führt zur homolytischen Spaltung der C=C Doppelbindungen in Uridyl-Basen, die sich dann in einer radikalischen Additionsreaktion mit Proteinseitenketten verbinden. Durch Verwendung radioaktiv markierter RNA kann man somit das entsprechende Protein radioaktiv markieren. Die RNA wird durch RNase in kleine Oligonukleotide verdaut. Das Protein wird dann spezifisch immunpräzipitiert und kann anschließend durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert werden. Durch die RNase-Behandlung sorgt man dafür, daß nur kleine RNA-Stücke an dem Protein gebunden bleiben, die seine elektrophoretische Mobilität nicht zu stark behindern.

Spleißreaktionen (24 µl Extrakt) wurden mit 720.000 cpm radioaktiv markierter Aktin prä-mRNA hoher spezifischer Aktivität zum Spleißen für 30 min bei 23°C inkubiert. Die prä-mRNA wurde wie in 3.2.2.10 hergestellt, jedoch mit der dreifachen Menge an [α -³²P]-UTP transkribiert (das UTP wurde zuvor eingedampft, um das Gesamtvolumen der Reaktion von 10 µl zu erhalten). Anschließend wurde die Reaktion auf Eis gestoppt und die Reaktionsmischung in 10 µl Aliquoten auf einen eisgekühlten Aluminiumblock, der mit sauberem Parafilm bespannt war, pipettiert. Diese Anordnung wurde im Eisbad unter eine UV-Lichtquelle gestellt (7 min, 2 cm Abstand von den Röhren). Danach wurden die Aliquote wieder vereinigt, mit 200 µl NET-2 100 (NET-2; siehe 3.2.3.3) verdünnt und mit 17,5 U RNase T1 versetzt und 35 min bei 37°C inkubiert. Es bildet sich ein Präzipitat, das abzentrifugiert wird. Der Überstand wird mit 20 µl IgG-Agarose (untersucht wurde Protein A-fusioniertes Snu17p, siehe Kapitel 4.7.4) in einem Gesamtvolumen von 500 µl (aufgefüllt mit NET-2 100) für 2h bei 4°C immunpräzipitiert. Danach wurde das Präzipitat mit 4 x 1ml NET-2 100 gewaschen, dann komplett in SDS-Probenpuffer aufgekocht, auf einem 13% SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographisch analysiert.

4 RESULTATE

4.1 Spezifische Aufreinigung von UsnRNPs aus Gesamtzellextrakten der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

Eine Möglichkeit zur Anreicherung von nativen snRNPs aus *S. cerevisiae* wurde bereits vor einiger Zeit in unserem Labor etabliert [123]. Grundlage dieser Aufreinigung ist die chromatographische Isolierung der snRNPs aus Gesamtzellextrakt mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers H20 [33], der gegen die 5'-terminale 2,2,7-Trimethylguanosin-kappe (m₃G-Kappe) der snRNAs gerichtet ist. Dieser Antikörper bindet die m₃G-Kappen der U1, U2, U4 und U5 snRNAs und somit können auf einer Chromatographiematrix mit immobilisierten H20-Antikörpern die entsprechenden snRNP-Partikel isoliert werden (Abb. 9 A). Das U6 snRNP, dessen RNA keine m₃G-Kappe trägt, wird hierbei im Komplex mit dem U4 snRNP (freies U4/U6 snRNP) oder als Teil des [U4/U6.U5] tri-snRNPs koisoliert. Je nach der Salzkonzentration im Zellextrakt, binden die einzelnen snRNPs unterschiedlich gut an den Antikörper [123]. Nach intensivem Waschen der Chromatographiematrix können die snRNPs durch Überleiten von 7-N-Methylguanosin (m⁷G), das mit der m₃G-Kappe um die Antikörperbindung kompetiert, in nativem Zustand von der H20-Säule eluiert werden. Durch diesen Schritt wird bereits eine sehr hohe Reinheit der snRNPs erreicht. Der Vergleich der Proteinkonzentrationen von snRNP-Eluat und Extrakt ergibt einen Reinigungsfaktor von ca. 250, zusätzlich werden die snRNPs ca. 50-fach konzentriert. Man kann daher von einer ca. 12.500-fachen Erhöhung der „spezifischen snRNP-Aktivität“ durch diesen Reinigungsschritt ausgehen. Allerdings werden in diesem Schritt auch nukleoläre snoRNPs (small nucleolar RNPs) aus dem Gesamtzellextrakt der Hefe isoliert. Diese Partikel sind an der Prozessierung und Modifikation der ribosomalen Vorläufer RNA (prä-rRNA) beteiligt und tragen ebenfalls eine m₃G-Kappe. Die relative Zusammensetzung des H20-Säuleneluats aus snRNPs und snoRNPs ist schwer abzuschätzen (ca. 50 % snRNPs). Eine weitere Fraktionierung der snRNPs (und snoRNPs) kann z.B. entweder durch Glyzeringradienten-Zentrifugation oder durch Ionenaustauscherchromatographie des Eluats erreicht werden. Die erstere Methode führt jedoch nur zu einer Anreicherung bestimmter, abundanter snRNPs und reicht zur Ermittlung der genauen Zusammensetzung dieser snRNPs nicht aus [123]. Die zweite Methode führt wegen der hohen Salzkonzentrationen, die zur Elution der snRNPs nötig sind, zum partiellen Zerfall der snRNPs.

Um aus der Gesamtmischung der sn(o)RNPs gezielt ein bestimmtes snRNP aufzureinigen, bietet es sich an, zuvor durch genetische Methoden an einem bereits bekannten,

snRNP-spezifischen Protein einen Affinitäts-"Tag" (engl.: Zusatz, loses Ende) anzubringen. Das entsprechende Gen wird dabei so modifiziert, daß das Protein konstitutiv z.B. mit einem zusätzlichen Polyhistidinpeptid exprimiert wird. Aus diesen Zellen wird dann ein Gesamtzellextrakt hergestellt (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.5.3). Zunächst erfolgt dann die oben beschriebene H20-Immunaффinitätschromatographie. Die erhaltene snRNP-Mischung, die nun auch das gewünschte polyhistidingetaggte snRNP-Protein enthält, wird anschließend einer Nickel-Metallaффinitätschromatographie unterworfen. Das Histidintag koordiniert spezifisch an immobilisierte Ni^{2+} -Ionen und somit wird das gewünschte snRNP auf der Nickel-Säule gebunden, während die anderen snRNPs sowie die snoRNPs durch die Ni^{2+} -Affinitätsmatrix hindurchlaufen (Abb. 9 B). Die Matrix wird ausgiebig gewaschen. Dann wird das darauf verbliebene snRNP-Partikel durch Überleiten eines Puffers mit Imidazol, welches die Polyhistidinpeptide von den Ni^{2+} -Ionen verdrängt, unter nativen Bedingungen eluiert. Durch diesen Schritt wird nochmals, je nach Abundanz des entsprechenden Partikels, eine 20-40-fache Reinigung des gewünschten snRNPs erzielt (theoretisch resultiert daraus über beide Chromatographieschritte eine Reinigung des snRNPs um einen Faktor $2,5 - 5 \times 10^5$).

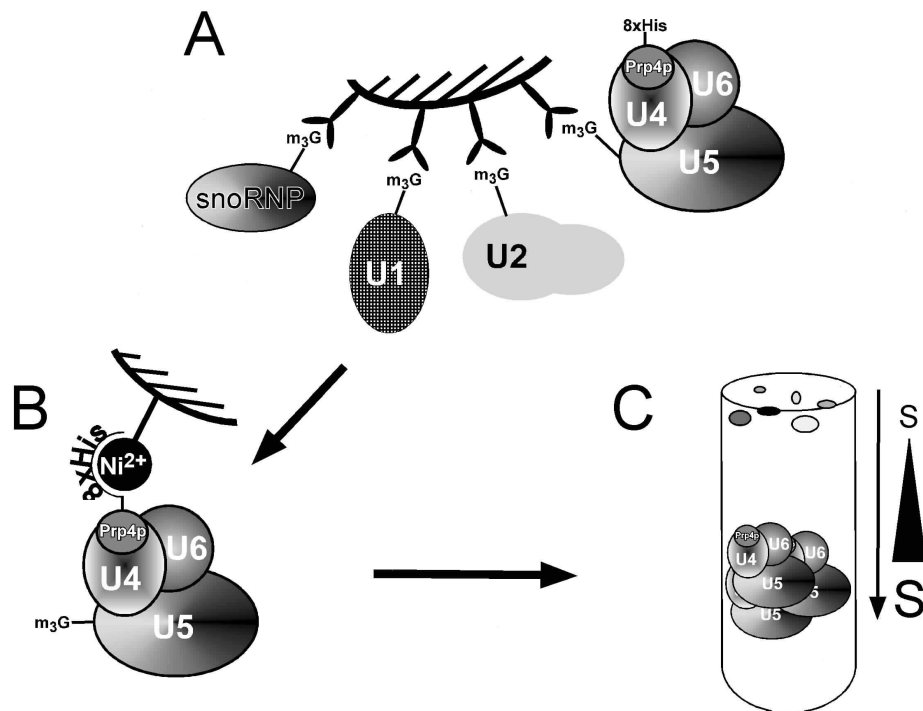


Abb. 9: Strategie zur spezifischen biochemischen Aufreinigung von UsnRNPs aus Hefe

Zur spezifischen Aufreinigung eines bestimmten snRNPs wird ein Hefestamm verwendet, der ein spezifisch mit dem gewünschten snRNP assoziiertes Protein mit einem Polyhistidinpeptid exprimiert. **A:** Im ersten chromatographischen Aufreinigungsschritt werden alle m³G-Kappen-tragenden snRNP- und snoRNP-Partikel über einen m³G-Kappen-bindenden Antikörper (H20) aus dem Gesamtzellextrakt isoliert. Diese können dann durch 7-Methylguanosin (m⁷G) im nativen Zustand vom H20 Antikörper verdrängt werden. **B:** Der zweite chromatographische Schritt dient der Isolierung des gewünschten snRNPs aus der Gesamtmischung aller sn(o)RNPs durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie über das Polyhistidin-Fusionsprotein. Das gereinigte snRNP kann durch Imidazol im nativen Zustand eluiert werden. **C:** Als letzter Schritt der Aufreinigung wird das snRNP durch Glyzeringradientenzentrifugation von unspezifisch koisolierten, nicht mit snRNPs assoziierten Proteinen getrennt.

Dennoch können abundante nicht-snRNP-Proteine, die mit geringer Spezifität an die Säulenmaterialien oder auch an das snRNP selbst binden, in das snRNP-Isolat verschleppt werden. Daher erfolgt als dritter Schritt zur Reinigung des snRNPs eine Glyzeringradienten-Zentrifugation (Abb. 9 C). Hierbei werden die nicht-assoziierten Proteine von dem snRNP-Partikel aufgrund ihres geringen Sedimentationskoeffizienten abgetrennt (je nach Molekulargewicht und Oligomerisierungsgrad zwischen 3 und 10S; im Gegensatz dazu haben die snRNPs Sedimentationskoeffizienten von 15–25S). Aliquote der Gradientenfraktionen werden durch Gelelektrophorese auf ihren snRNA- und Proteingehalt hin analysiert. Die Peakfraktionen werden vereinigt, die darin enthaltenen Proteine werden dann durch Massenspektrometrie identifiziert (siehe Kapitel 3.4). Die gereinigten snRNPs können auch für funktionelle Experimente *in vitro* oder zur Strukturanalyse mit elektronenmikroskopischen Methoden verwendet werden.

Die Aufreinigung der verschiedenen in dieser Arbeit charakterisierten UsnRNPs erfolgte stets nach diesem Prinzip, sie wird daher im Detail nur einmal am Beispiel des U1 snRNP beschrieben. Für die anderen snRNPs werden nur abweichende Bedingungen angegeben.

4.2 Massenspektrometrische Analyse snRNP-assoziiierter Proteine sowie Identifizierung ihrer Gene in der Hefegenom-Datenbank

Spezifisch gereinigte snRNP-Proteine lassen sich aus der Bäckerhefe aufgrund ihrer niedrigen zellulären Konzentration nur in geringen Mengen darstellen. Diese sind meist nicht ausreichend, um die Proteine einer klassischen Sequenzanalyse durch Edman-Abbau zu unterziehen [148]. Es ist daher notwendig, empfindlichere Methoden anzuwenden, die die Peptid-Sequenzierung auch im femto-molaren Bereich zulassen. In Zusammenarbeit mit Dr. Gitte Neubauer in der Arbeitsgruppe von Dr. Matthias Mann am Europäischen Molekularbiologischen Labor (EMBL) in Heidelberg konnte hierzu die massenspektrometrische Peptidanalyse genutzt werden. Auf diesem Arbeitsgebiet wurden in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt, was zu einer drastischen Reduzierung der notwendigen Proteinmengen führte [124, 125]. Insbesondere ist hierbei die Entwicklung der Nano-Electrospray- (Nano-ES-) Technik hervorzuheben [149].

Das prinzipielle Vorgehen sei kurz illustriert: Die gereinigten Proteine werden zunächst durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt und im Gel durch Färbung mit Coomassie-Blau oder Silber visualisiert. Die einzelnen Proteinbanden, die auch Mischungen von Proteinen enthalten können, werden aus dem Gel ausgeschnitten und im Gel mit einer Sequenzspezifischen Endoproteinase (hier meist Trypsin) inkubiert. Dadurch werden die Proteine zu Peptiden unterschiedlicher Längen hydrolysiert (Abb. 10 A). Die Peptide werden aus dem Gel eluiert und massenspektrometrisch analysiert. Hierbei kommen zwei verschiedene Methoden zur Anwendung. Mit MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight) Massenspektrometrie kann eine Peptid-Massenkarte des entsprechenden Proteins erstellt werden ([150]; Abb. 10 B). Aus einem bestimmten Protein wird durch die sequenzspezifische Hydrolyse mit Trypsin eine ganz bestimmte, nur für dieses Protein charakteristische Mischung von Peptiden diskreter Massen erzeugt. Mit einem entsprechenden Suchprogramm kann dann in der Hefegenom-Datenbank nach dem Gen gesucht werden, dessen Proteinprodukt theoretisch genau dieses Peptid-Massenmuster erzeugt [151] (Abb. 10 D). Sind jedoch die Mengen an Protein nicht groß genug, um mehrere Peptide zu identifizieren (eine eindeutige Identifizierung des Proteins ist dann manchmal nicht möglich), oder befinden sich Proteinmischungen in der entsprechenden Bande, so wird als alternative Methode die Nano-Electrospray Tandem-Massenspektrometrie angewendet (Abb. 10 C). Hierbei werden die Peptide aus der Mischung zunächst in einem ersten Massenspektrometer nach ihren Massen aufgetrennt. Ein bestimmtes Peptid, das von einem

einzelnen Protein stammt, wird dabei selektioniert und in einer Kollisionskammer mit Inertgasmolekülen (z.B. Argon) „bombardiert“, wobei es, zumeist an den Peptidbindungen, in kürzere Fragmente aller Größen zerbricht. Diese Mischung von Peptiden, die sich in ihrer Länge nur um eine Aminosäure unterscheiden, wird in einem zweiten Massenspektrometer erneut aufgetrennt. Aufgrund der charakteristischen Massenunterschiede, die genau der Masse einer Aminosäure entsprechen, kann dann eine Teilsequenz des Peptids ausgelesen werden. Hierbei ist es wichtig, mit der begrenzten Menge an Peptiden möglichst lange (>30 min.) messen zu können. Speziell hierfür wurde die Nano-Electrospray-Ionenquelle entwickelt, die die Peptidionen mit einer extrem geringen Flußrate von ca. 1 µl Peptidlösung pro Stunde in das Massenspektrometer einspeist [149].

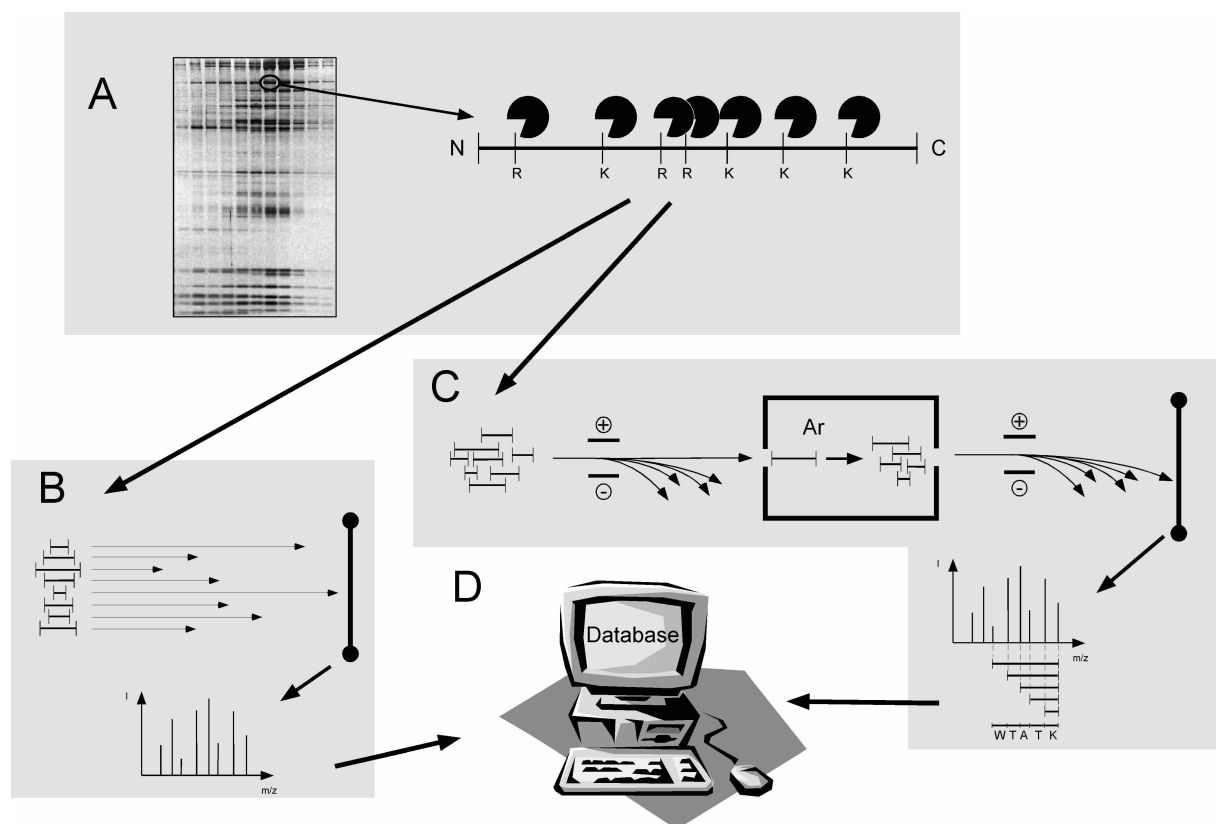


Abb. 10: Massenspektrometrische Analyse und Identifikation von UsnRNP-Proteinen

A: Isolierte Proteine werden im Gel angefärbt und die Banden ausgeschnitten. Mit einer sequenzspezifischen Endoproteinase wird das Protein in Peptide gespalten. Ein bestimmtes Protein erzeugt dabei einen charakteristischen Satz an Peptiden diskreter Massen. **B:** Die Peptide werden durch Laserbeschuss aus einer Matrix heraus ionisiert und in einen Flugzeit-Analyzator eingespeist, der deren Massen vermisst (MALDI-TOF). Die gewonnene Peptidmassenkarte wird dann zur Identifizierung des zugehörigen Gens in der Hefegenomdatenbank benutzt (**D**). **C:** Befinden sich mehrere Proteine in einer Bande oder sind die Mengen zu gering, so wird die Tandem-Massenspektrometrie angewendet. Die Peptidmischung wird über einen langen Zeitraum hinweg mit einer sehr geringen Flußrate aus einer Glaskapillare, die gleichzeitig als Anode dient, ionisiert und in ein Massenspektrometer eingespeist (nano-Electrospray). Dort wird ein einzelnes Peptid einer bestimmten Masse selektioniert und in eine Kollisionskammer mit Inertgas (Argon) geleitet. Durch Kollisionen mit den Gasatomen wird das Peptid an den Peptidbindungen fragmentiert, so daß kleinere Peptide entstehen, die sich nur durch die Masse einer Aminosäure unterscheiden. In einem zweiten Massenspektrometer werden diese Peptidfragmente analysiert, so daß eine Teilsequenz ausgelesen werden kann. Die Kombination der Informationen von Gesamtmasse des Peptids, Teilsequenz, Massendistanz von den Termini dieser Teilsequenz zu den N- und C-Termini des Peptids sowie der Kenntnis der C-terminalen Aminosäure (wegen des spezifischen Proteaseverdaus), genügt zur eindeutigen Identifikation des Gens, welches dieses Peptid kodiert, in der Hefegenomdatenbank (**D**).

Zusammen mit der Masseninformation des ursprünglichen Peptids, der Kenntnis der C-terminalen Aminosäure (aufgrund des spezifischen Endoproteinaseverdaus) und der Kenntnis einer Teilsequenz, kann das Peptid im Hefeproteom gefunden und somit das zugehörige Protein identifiziert werden (Abb. 10 D). Dieses setzt natürlich voraus, daß die Sequenz des gesamten Genoms des entsprechenden Organismus bekannt ist. Die vollständige Sequenzierung des Genoms der Bäckerhefe wurde 1997 beendet [126]. Diese Methodik kann jedoch auch zur Analyse menschlicher Proteine erfolgreich angewendet werden. Zwar ist die Sequenzierung des Humangenoms noch nicht abgeschlossen, ein Großteil der menschlichen Geninformation liegt aber, zumindest in Form kurzer Stücke von cDNA (sogenannten ESTs – expressed sequence tags), bereits vor.

4.3 Isolierung des U1 snRNPs und Charakterisierung seiner Proteinkomponenten

4.3.1 Isolierung des U1 snRNPs

Zu Beginn der Arbeit war es wichtig, ein "Modellpartikel" auszuwählen, an dem die bereits etablierten Methoden zur Isolierung der Hefe-snRNPs weiterentwickelt werden konnten. Als Ziel sollte hierbei die spezifische Isolierung eines einzelnen snRNPs erreicht werden. Hierzu bot sich zunächst das U1 snRNP an. Dieses Partikel ist, zusammen mit dem U2 snRNP, das am häufigsten vertretene UsnRNP in der Hefezelle. Aus mehreren Gründen ist das Hefe U1 snRNP ein interessantes Forschungsobjekt: Die Fraktionierung der Gesamt-snRNPs hatte gezeigt, daß sich das Hefe U1 snRNP in seiner Proteinzusammensetzung wahrscheinlich deutlich von seinem humanen Gegenstück unterscheidet [123]. Das Hefe U1 snRNP sedimentiert als ein 18S Partikel, während das humane U1 snRNP mit 12S deutlich kleiner ist. Die Hefe U1 snRNA ist deutlich länger als die des humanen U1 snRNPs und durch genetische Untersuchungen waren zwei U1 snRNP Proteine der Hefe identifiziert worden (Prp39p und Prp40p), für die keine Gegenstücke im humanen U1 snRNP bekannt sind [83, 84]. Das U1 snRNP ist entscheidend an den frühen Schritten des Spleißprozesses beteiligt und ist als Teil des ersten detektierbaren spleißosomalen Komplexes (Commitment Complex, E-Komplex) für die Erkennung der 5'-Spleißstelle der prä-mRNA verantwortlich. Diese frühen spleißosomalen Abläufe unterscheiden sich in Hefe und Mensch wahrscheinlich auch mechanistisch und ein genauer Vergleich der U1 snRNPs in den beiden Spezies könnte weitere Aufschlüsse über die Details und Bedeutung dieser Unterschiede erbringen.

Um das U1 snRNP spezifisch zu isolieren, wurde ein Hefestamm benötigt, der ein U1-spezifisches Protein konstitutiv mit einem Polyhistidin-Peptid exprimiert. Ein solcher Stamm wurde mir freundlicherweise von Dr. B. Séraphin (EMBL, Heidelberg) zur Verfügung gestellt (Stamm BSY283). Dieser Stamm exprimiert ein N-terminales Hexahistidinpeptid am U1-spezifischen Snp1p Protein (dem Orthologen des humanen U1 70K Proteins). Die genetischen Methoden zur Erzeugung von Hefestämmen mit Polyhistidin-markierten Proteinen werden später beispielhaft anhand des Proteins Aar2p erläutert (siehe Kapitel 4.6.2).

Ein Gesamtzellextrakt (ca. 150 ml) wurde aus 180g BSY283 Zellen hergestellt (siehe Kapitel 3.2.5.3). Der Extrakt wurde zur Einstellung des Salzgehaltes gegen Puffer D (20 mM Hepes/KOH, pH 7,9; 8% Glyzerin) mit 200 mM KCl dialysiert. Anschließend wurde das Dialysat über Nacht über eine anti-m₃G-Affinitätschromatographiesäule mit 1,5 ml CNBr-aktivierter Sepharose 4B und dem daran gekoppelten monoklonalen Antikörper H20 geleitet. Nach intensivem Waschen der H20-Matrix mit 3 x 6 ml Puffer D200 (vgl. Abb. 11, Spuren 3-

5) wurden die UsnRNPs und snoRNPs durch Überleiten von 4,5 ml einer 20 mM Lösung von m^7G in Puffer D200 eluiert. Die H20-Affinitäts-Säule wird anschließend durch Waschen mit 4 x 2 ml einer 8M Lösung von Harnstoff in Puffer D200 (vgl. Abb. 11, Spuren 8-11), sowie anschließend mit 50 ml Puffer D200 regeneriert. Aliquote der erhaltenen Fraktionen der chromatographischen Aufreinigung wurden nach Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol durch denaturierende Elektrophorese in Harnstoff-haltigen Gelen und anschließende Silberfärbung auf ihren RNA-Gehalt hin analysiert (Abb. 11).

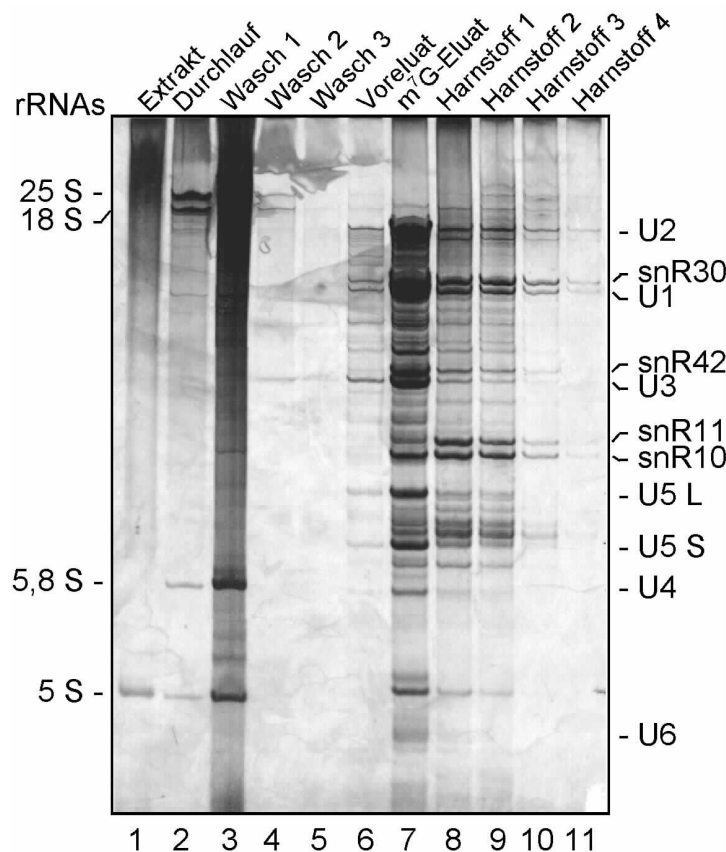


Abb. 11: Immunaффinitätschromatographie von sn(o)RNPs aus Hefe-Gesamtzellextrakt mit H20-Sepharose

SnRNPs und snoRNPs wurden aus einem Gesamtextrakt aus BSY283 Hefezellen durch Immunaффinitätschromatographie mit dem monoklonalen Antikörper H20 aufgereinigt. RNAs wurden aus den Fraktionen extrahiert und durch denaturierende Harnstoff-Gelelektrophorese (8%iges Gel) und Silberfärbung analysiert. In den einzelnen Spuren wurde aufgetragen: 1: 10 µl Gesamtextrakt; 2: 10 µl Durchlauf; 3-5: Waschfraktionen 1-3 (50, 100, 500 µl); 6: 100 µl Voreluatfraktion; 7: 150 µl m^7G Eluat; 8-11: je 200 µl der Harnstoffwaschfraktionen. Rechts sind die U2, U1, U5 L, U5 S, U4, U6 sowie snR30, snR42, snR11, snR10 und U3 RNAs, links die Position ribosomaler RNAs indiziert.

Die RNA Analyse zeigt im m^7G -Eluat mehrere abundante RNA-Spezies, von denen einige durch Northern Blot-Analyse eindeutig als UsnRNAs oder snoRNAs identifiziert wurden (nicht gezeigt). Die wichtigsten RNAs sind in Abb. 11 markiert. Bei 200 mM KCl werden mit der H20-Säule also effizient die U2, U1 und freien U5 snRNPs, sowie weniger effizient die zum tri-snRNP gehörigen U4, U5 und U6 bzw. freie U4/U6 di-snRNPs aufgereinigt (das tri-snRNP wird effizienter bei 100 mM KCl isoliert; siehe Kapitel 4.4.1). Desweiteren sind die snoRNPs snR10, 11, 30 und 42, sowie U3, stark vertreten, in geringeren Mengen waren aber auch zahlreiche weitere snoRNPs in dem m^7G -Eluat enthalten.

Die Proteinanalyse der korrespondierenden Fraktionen aus Abb. 11 zeigte eine sehr komplexe Mischung von Proteinen aller Größen in dem m^7G -Eluat, die ohne weiterführende

Untersuchungen (z.B. Glyzeringradienten-Zentrifugation zur weiteren Fraktionierung der snRNPs; siehe [123]) nicht einfach zu bewerten ist (nicht gezeigt; vgl. aber Abb. 12, Spur 1).

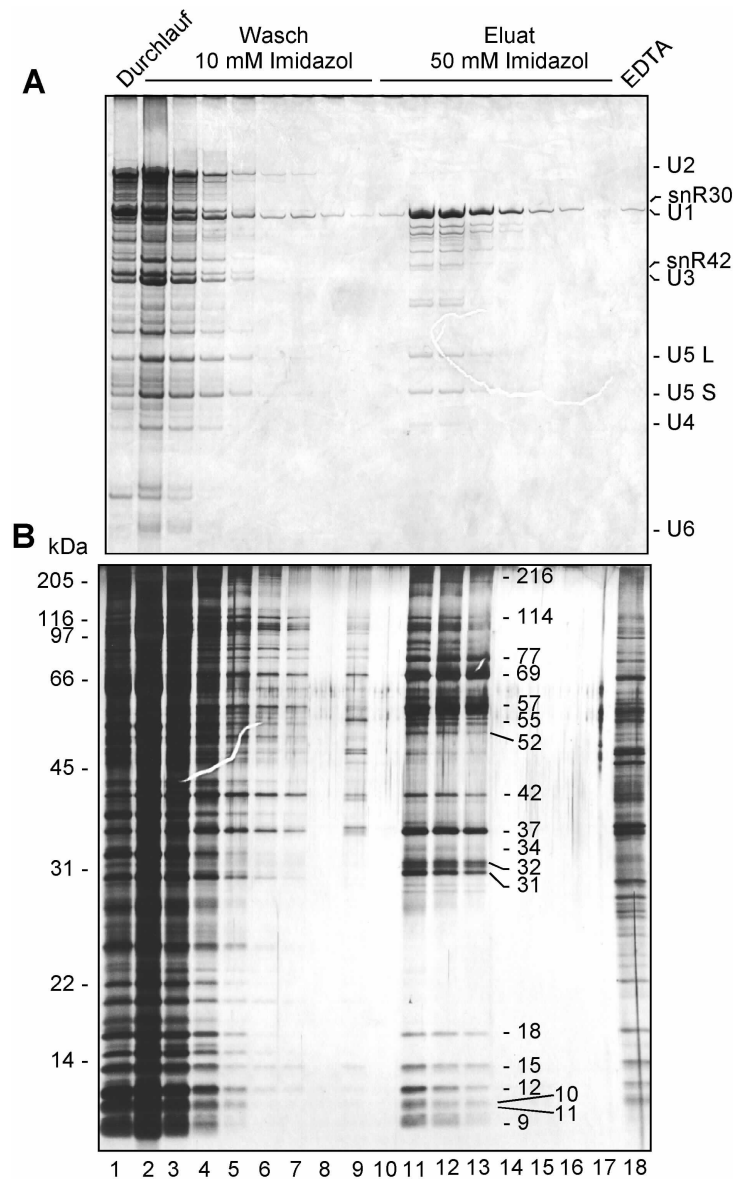


Abb. 12: Reinigung des U1 snRNPs aus dem m⁷G-Eluat der H20-Säule durch Ni²⁺-NTA-Chromatographie

Das U1 snRNP wurde aus der Gesamtmischung der sn(o)RNPs auf Ni-NTA-Agarose isoliert. Dazu wurde das in Abb. 12 erhaltene m⁷G-Eluat über eine 0,5 ml Ni-NTA-Agarosesäule geleitet, unspezifisch gebundenes Material wurde mit 10 mM Imidazol in D300 gewaschen und das U1 snRNP (zusammen mit geringen Mengen an U5 snRNPs) mit 50 mM Imidazol in D300 eluiert. Gezeigt sind die silbergefärbten RNAs (A; nach denaturierender Harnstoff-Gelelektrophorese) und Proteine (B; nach SDS-PAGE) von je 1/15 der Wasch- (Spuren 2-9) und Eluatfraktionen (Spuren 10-17). In Spur 1 ist 1/20 des Säulendurchlaufs aufgetragen, in Spur 18 100 µl eines Kontrolleluates mit 100 mM EDTA. Rechts ist in A die Identität der sn(o)RNAs gezeigt, in B sind die Proteinbanden mit ihrem Molekulargewicht sowie links die Positionen von Molekulargewichtsmarkern (kDa) indiziert. Die Protein-Probe in Spur 8 ging während der Aufarbeitung verloren.

Um das U1 snRNP spezifisch aus der Gesamtmischung der UsnRNPs und snoRNPs zu isolieren, wurde das m⁷G-Eluat, über eine Ni-NTA-Agarose Säule mit 0,5 ml Matrixvolumen geleitet. Zuvor wurde die KCl-Konzentration der Mischung auf 300 mM erhöht, um die

unspezifische Bindung von nicht-snRNP-Proteinen an die Säulenmatrix zu verringern. Nach intensivem Waschen der Matrix mit 8 x 1,5 ml einer 10 mM Lösung von Imidazol in Puffer D300, wurde das U1 snRNP mit 8 x 1 ml einer 50 mM Imidazol-Lösung (in D300) eluiert. Der RNA- und Proteingehalt von je 1/15 der Fraktionen wurde wiederum gelektrophoretisch analysiert (Abb. 12 A (RNA) und B (Proteine)).

Die ersten drei Eluat-Fractionen enthielten die Hauptmenge an U1 snRNP, allerdings waren auch geringe Mengen der beiden U5 snRNAs nachweisbar (U5 L und U5 S; Abb. 12 A). Dies wurde durch Northern-Blot Analyse überprüft (nicht gezeigt). Im Vergleich zum Gehalt der Durchlauf- und Waschfraktionen läßt sich abschätzen, daß ca. 90 % der im m⁷G-Eluat enthaltenen U1 snRNPs spezifisch auf der Ni-NTA-Säule gebunden und davon wieder eluiert wurden. Die Analyse der im Ni-NTA-Eluat enthaltenen Proteine (Abb. 12 B) zeigt 20 abundante Protein-Banden mit Molekulargewichten von ca. 10 bis über 200 kDa.

Es war zunächst unklar, ob alle diese Proteine mit dem U1 snRNP assoziiert sind, oder ob sich darunter auch Proteine befinden, die unspezifisch über die Ni-NTA-Säule aufgereinigt wurden. Außerdem waren auch geringe Mengen an U5 snRNA in dem Eluat vorhanden, so daß sich möglicherweise auch U5 snRNP-spezifische Proteine in dem Eluat befanden. Um eine Klassifizierung der Proteine als U5- oder U1-spezifisch zu ermöglichen, wurden die U1 snRNP-haltigen Eluatfraktionen einer 10-30% Glyzeringradienten-Zentrifugation unterzogen. Parallel wurden rRNAs aus Hefe als Sedimentationsmarker (5, 5.8, 18 und 25S) zentrifugiert. Nach beendeter Zentrifugation wurde die Lösung von oben her zu je 500 µl fraktioniert und die Fraktionen wurden auf ihren RNA- und Proteingehalt hin untersucht (Abb. 13 A und B).

Die U1 snRNA befand sich in Fraktionen, die einem Sedimentationskoeffizienten von ca. 18S entsprechen, während die beiden U5 snRNAs in Fraktionen von ca. 15S zu finden waren. Dies verdeutlicht, daß sich in dem Eluat (intakte) U1 snRNPs mit dem erwarteten Sedimentationsverhalten, aber auch freie U5 snRNPs (nicht im 25S [U4/U6.U5] tri-snRNP gebunden) befanden. Die beiden Partikel ließen sich durch die Gradienten-Zentrifugation zumindest partiell trennen. Die Koisolierung von U5 snRNP mit dem U1 snRNP ließ vermuten, daß zwischen den beiden Partikeln eine spezifische (Protein-Protein-) Wechselwirkung besteht, die jedoch, vermutlich durch Verdünnungseffekte oder auch Scherkräfte, während der Glyzeringradienten-Zentrifugation zerstört wird (siehe dazu auch Kapitel 4.6.3).

Die Proteinanalyse der Glyzeringradienten-Fractionen ergab, daß 15 der 20 Protein-Banden mit der U1 snRNA in den 18S-Fractionen kosedimentierten (Abb. 13 B). Diese Proteine von 77, 69, 57, 55, 52, 37, 34, 32, 31, 18, 15, 12, 11, 10 und 9 kDa sind somit höchstwahrscheinlich spezifisch mit dem U1 snRNP assoziiert. Die Proteinkomposition des Hefe-U1 snRNPs ist somit wesentlich komplexer als die des humanen Gegenstücks, das nur 10 Proteine enthält. Drei weitere Proteine von 216, 115 und 42 kDa kosedimentierten mit der U5

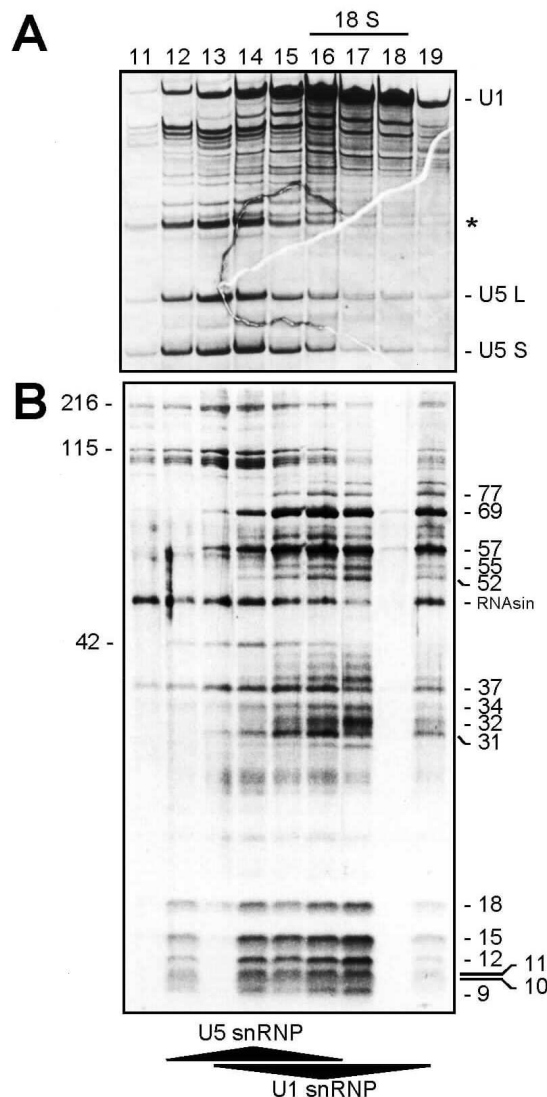


Abb. 13: Glyzergradienten-Zentrifugation des (U1 snRNP-haltigen) Ni^{2+} -NTA-Eluats

Das Ni-NTA Eluat aus Abb. 12, Spuren 11-13, wurde zur Abtrennung des U1 snRNP von unspezifisch gebundenen Proteinen auf einem 10-30 % Glyzergradienten zentrifugiert (24h; 29000 U/min). Der Gradient wurde vom oberen Ende des Röhrchens her in 25 Fraktionen aliquotiert. RNAs (A) und Proteine (B) wurden aus den Gradientenfraktionen extrahiert und nach denaturierender Harnstoff- bzw. SDS-PAGE mit Silber gefärbt. Das U1 snRNP kosedimentiert mit 15 Proteinen (in B rechts indiziert) in den Fraktionen 15-17, bei 18 S. Das freie U5 snRNP hat ein Sedimentationsmaximum bei ca. 15S (Fraktionen 12-14) mit drei spezifischen Proteinen (in B links indiziert) und sechs kleinen Proteinen (9-18 kDa), die auch in den U1 snRNP-Fraktionen zu sehen sind. Eine unbekannte RNA ist in A mit einem Stern, in B ist ein exogen zugefügter RNase-Inhibitor indiziert. Die Protein-Probe aus Fraktion 18 ging während der Aufarbeitung verloren.

snRNA in den Fraktionen um 15S. In diesen Fraktionen befinden sich zusätzlich sechs kleine Proteine (9-18 kDa), die auch in den U1 snRNP Fraktionen vorhanden sind. Bei diesen Proteinen handelt es sich daher sehr wahrscheinlich um die Sm Proteine, die den U1, U2, U4 und U5 snRNPs gemeinsam sind. Die zwei restlichen Proteine (36 und 38 kDa) verblieben am oberen Ende des Gradienten als nicht-snRNP gebundene, kontaminierende Proteine (in Abb. 13 nicht gezeigt).

4.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung des isolierten U1 snRNP-Partikels

Das biochemisch isolierte Hefe-U1 snRNP war laut der gelelektrophoretischen Analyse rein genug, um es auch mit Hilfe der Elektronenmikroskopie zu untersuchen. Diese Methode wurde bereits seit Jahren zum Studium der menschlichen UsnRNPs verwendet (siehe Einleitung) und vermittelt einen guten Eindruck von der strukturellen Organisation dieser Partikel. Insbesondere der Vergleich der Struktur des Hefe-U1 snRNPs mit seinem menschlichen Gegenstück sollte interessante Erkenntnisse erbringen. So könnte sich die Präsenz zusätzlicher Proteine im Hefe-U1 snRNP auch auf die makromolekulare Struktur des Partikels auswirken. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Berthold Kastner in unserem Labor durchgeführt.

Das U1 snRNP wurde dazu aus den entsprechenden Fraktionen eines Glyzeringradienten, der dem im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen entsprach, in reiner Form gewonnen. Aus der Gradienten-Lösung heraus wurden die U1 snRNPs an einem Kohlenstoff-Film adsorbiert, der dann auf einem Mikrokupfernetz befestigt wurde. Die adsorbierten Partikel wurden mit Uranyl-Formiat negativ gefärbt und mit einem zweiten Kohlenstoff-Film bedeckt. Anschließend wurden diese Proben im Transmissions-Elektronenmikroskop untersucht. Typische Ansichten sind in Abb. 14 A wiedergegeben.

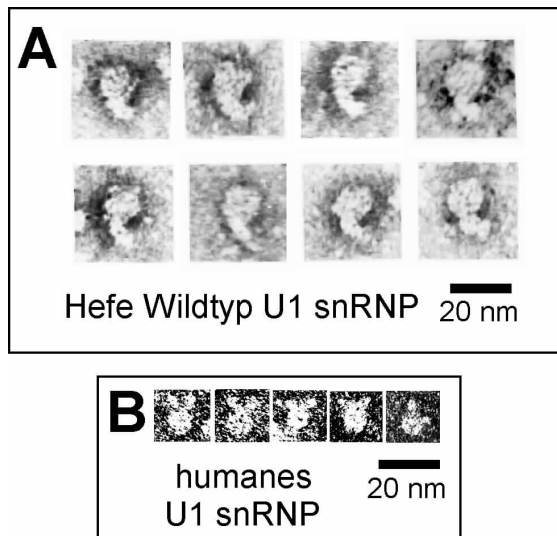


Abb. 14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von U1 snRNPs der Hefe und des Menschen

A: Das U1 snRNP-Partikel der Hefe wurde biochemisch aufgereinigt, wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben. Die Partikel wurden aus den entsprechenden Fraktionen des Glyzeringradienten heraus auf einem Kohlenstoff-Film adsorbiert, dieser wurde anschließend auf Mikrokupfernetze aufgezogen. Die adsorbierten U1 snRNP Partikel wurden dann mit einer Uranyl-Formiat-Lösung inkubiert, die als Kontrastmittel dient. Sie bettet das Partikel ein und dringt in Vertiefungen der Oberfläche ein. Somit erscheinen die U1 snRNPs durch die erhöhte Elektronendichte der Uranyl-Ionen im elektronenmikroskopischen Bild negativ angefärbt. Der erste Kohlenstoff-Film mit den darauf adsorbierten und gefärbten U1 snRNPs wurde dann mit einem zweiten Kohlenstoff-Film bedeckt. Diese Anordnung diente als Untersuchungsobjekt in einem Transmissions-Elektronenmikroskop. Der Balken entspricht 20 nm. **B:** Zum Vergleich sind auch menschliche U1 snRNPs gezeigt.

Die U1 snRNPs der Hefe (Abb. 14 A) zeigten im Elektronenmikroskop eine einheitliche Morphologie mit sehr ähnlich aussehenden Projektionsformen. Die Struktur des Hefe-U1 snRNPs setzt sich aus einer größeren, in etwa kreisrunden Domäne mit einem Durchmesser von etwa 10 nm, und einer zweiten, elongierten Domäne zusammen, die sich aus der runden Domäne in einem Bogen gleichsam "heraus" erstreckt. Diese zweite Domäne ist ebenfalls etwa 10 nm lang, so daß das Hefe-U1 snRNP eine maximale Ausdehnung von 20 nm hat. Diese Struktur unterscheidet sich deutlich in Größe und Form von der des menschlichen U1 snRNPs (Abb. 14 B). Letzteres hat eine runde core Domäne von 8 nm Durchmesser, aus der zwei Protuberanzen herausragen. Diese werden durch die Proteine 70k und A gebildet, wie durch Markierung mit spezifischen Antikörpern ermittelt werden konnte [152]. In ihrer längsten Ausdehnung sind die menschlichen Partikel nur etwa 14 nm groß.

Die U1 snRNPs der Hefe scheinen also nicht nur mehr Proteine zu enthalten als ihr menschliches Gegenstück, sondern sie haben auch noch eine gänzlich andere Struktur. Dies ist insoweit interessant als man erwarten könnte, daß das Hefe-U1 snRNP eine Domäne enthält, die der Struktur des menschlichen U1 snRNPs entspricht, sowie eine weitere Domäne, die durch die zusätzlichen Proteine gebildet wird. Jedoch läßt sich die Struktur des menschlichen Partikels "optisch" nicht als Teil der Struktur des Hefe-Partikels wiederfinden.

4.3.3 Massenspektrometrische Analyse der U1 snRNP-Proteine

Die Identifikation der U1 snRNP-Proteine erfolgte mit Hilfe der in Kapitel 4.2 beschriebenen massenspektrometrischen Methoden, in Zusammenarbeit mit Dr. G. Neubauer und Dr. M. Mann (EMBL, Heidelberg). Da sich im Eluat der Nickel-Säule im wesentlichen reines U1 snRNP und vermutlich nur drei U5-spezifische Proteine befanden, wurde dieses Eluat unfractioniert für die Proteinidentifikation eingesetzt. Die Proteine wurden aus den U1 snRNP-haltigen Eluatfraktionen extrahiert, vereinigt und auf einem 12%igen, dentaurenden Polyacrylamid-SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt (Abb. 15) und die 20 stark gefärbten Banden wurden ausgeschnitten. Anhand der Färbung ließ sich abschätzen, daß etwa 20 µg U1 snRNP Proteine isoliert wurden, was in etwa 30 pmol pro Protein entspricht. Alle Banden konnten durch die massenspektrometrische Analyse eindeutig Proteinen des Hefeproteoms zugeordnet werden. Zwei Banden (69 und 31 kDa) enthielten je zwei Proteine bzw. Abbauprodukte. Diese konnten dennoch mit Hilfe der Nano-ES Methode eindeutig identifiziert werden. Insgesamt konnten 21 verschiedene Proteine identifiziert werden. Beispielhaft ist in Abb. 16 (A-C) gezeigt, wie Peptide aus der 15 kDa Proteinbande durch Nano-ES analysiert wurden; Abb. 16 D zeigt die massenspektrometrische Identifizierung von zwei Proteinen aus der 69 kDa Bande.

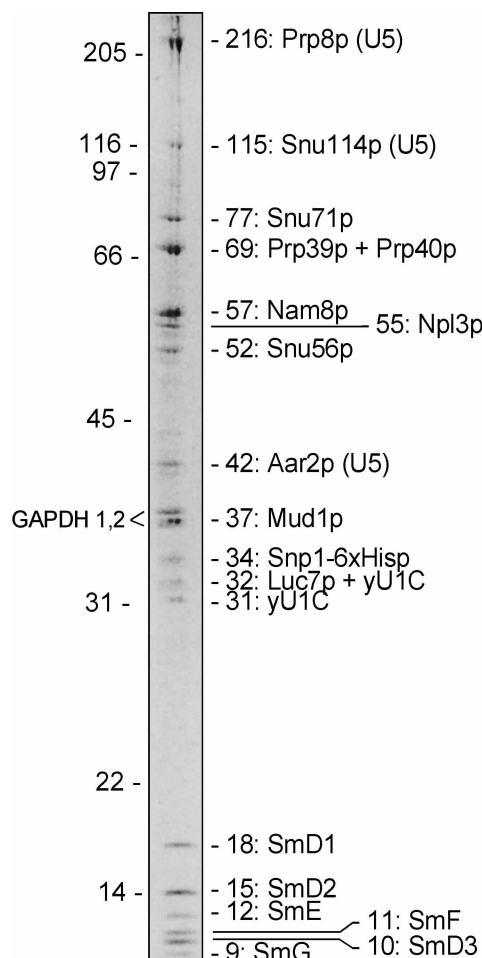


Abb. 15: Die Proteine des U1 snRNP-Eluats wurden massenspektrometrisch identifiziert

Die Proteine des U1 snRNP-haltigen Ni-NTA-Eluats wurden extrahiert, auf einem 12%igen Polyacrylamid-SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt und schließlich durch Massenspektrometrie analysiert und identifiziert. Molekulargewichte sind links angegeben, die apparenten Molekulargewichte und die Identität der Proteine sind rechts indiziert. U5-Proteine sind in Klammern (U5) angedeutet, kontaminierende nicht-snRNP-Proteine links, alle anderen Proteine gehören zum U1 snRNP. Sechs Proteine entsprechen den gemeinsamen core Sm Proteinen, zehn sind U1 snRNP-spezifisch, drei sind U5 snRNP-spezifisch und zwei Proteine waren die unspezifisch kosisolierten Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenasen (GAPDH), Isoformen 1 und 2.

Unter den 21 Proteinen des Ni-NTA-Eluates befanden sich zehn bereits bekannte snRNP-Proteine. Zwei von diesen sind die U5 snRNP-spezifischen Proteine Prp8p (216 kDa) und Snu114p (115 kDa), im Einklang damit kosedimentieren diese Proteine im Glyzeringradienten mit den U5 snRNAs (Abb. 13; Fraktionen 13 und 14). Ein drittes U5 Protein ist Aar2p (42 kDa), welches später noch ausführlich behandelt wird (siehe Kapitel 4.6). Vier weitere der bekannten Proteine

sind die Sm core Proteine SmD1 (18 kDa), SmD3 (10 kDa), SmF (11 kDa) und SmG (9 kDa). Die übrigen vier Proteine sind die (einzigen zu Beginn dieser Arbeit bekannten) Hefe-U1-spezifischen Proteine Prp39p und Prp40p (beide 69 kDa), Mud1p (37 kDa) und Snp1p (34 kDa). Diese vier Proteine sedimentierten im Glyzeringradienten zusammen mit der U1 snRNA bei 18S (Abb. 13; Fraktionen 15-18).

Drei bislang unbekannte Proteine erwiesen sich als Orthologe der humanen Proteine U1-C (32 und 31 kDa, letzteres ein Abbauprodukt) und der Sm Proteine SmD2 (15 kDa; siehe Abb. 16 C) und SmE (12 kDa). Ein Orthologes zum humanen Protein SmB wurde in diesem U1 snRNP-Isolat nicht identifiziert, da es vermutlich bei der biochemischen Isolierung verloren gegangen ist. SmB konnte jedoch in anderen snRNP-Partikeln eindeutig nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.4.2 und 4.6.3). Außerdem konnte durch Immunpräzipitationsstudien gezeigt werden (in Zusammenarbeit mit Dr. B. Séraphin, EMBL), daß dieses Protein auch mit dem U1 snRNP assoziiert ist [153]. Die restlichen fünf potentiellen snRNP-Proteine waren entweder noch gänzlich unbekannt, oder es handelte sich um Proteine, die zwar bereits untersucht wurden, für die aber keine Assoziation mit U1 snRNPs nachgewiesen worden war. Diese Proteine werden von den folgenden offenen Leserahmen (ORFs) oder Genen kodiert: 77kDa - YGR013w; 57 kDa - *NAM8*; 55 kDa - YDR240c; 52 kDa - *NPL3* und 31 kDa - *LUC7*.

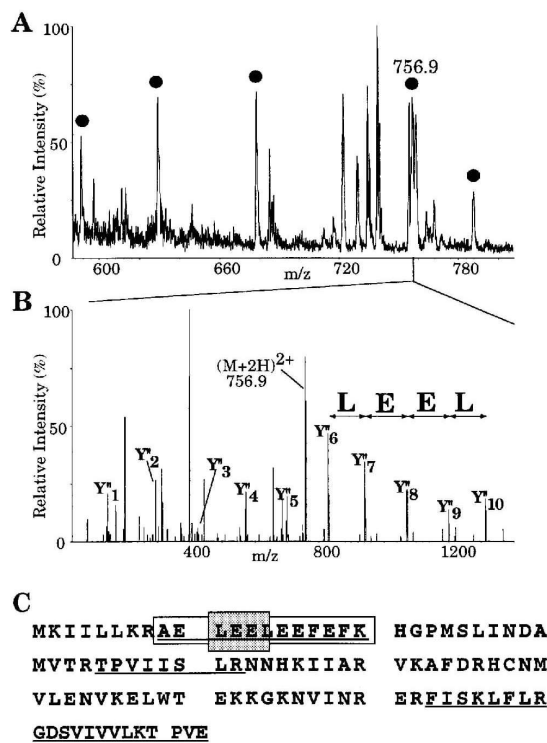


Abb. 16: Massenspektrometrische (Nano-ES) Analyse von U1 snRNP-Proteinen

A: Teil des Massenspektrums der Peptidmischung, die nach proteolytischem Verdau der 15 kDa Bande aus Abb. 15 mit Trypsin resultierte. **B:** Fragmentierungsmuster des Massenpeaks bei m/z 756,9 aus A. Die Massendifferenz einiger prominenter Massenpeaks entspricht jeweils der Masse einer Aminosäure, so daß eine Teilsequenz des Peptids ausgelesen werden kann (LEEL). Zusammen mit der Information über die Gesamtmasse des Peptids, sowie des Massenabstandes zum N- bzw. C-Terminus des Peptids kann diese Sequenzinformation genutzt werden, das Gen, welches genau für dieses Peptid kodiert, mit Hilfe des Computer-

programms PEPTIDSEARCH in der Genomdatenbank der Hefe zu identifizieren [151]. Die Sequenz des identifizierten Peptids ist AELEEELEEFK. Die zugehörige Proteinsequenz (SmD2), sowie weitere von diesem Protein identifizierte Peptide sind in **C** gezeigt (unterstrichen). **D:** Identifizierung von Prp39p und Prp40p in der 69kDa Bande aus Abb. 15. Peptide, die zu Prp39p gehören, sind mit einem Stern markiert, die zu Prp40p gehörenden mit einem ausgefüllten Kreis.

4.3.4 Sequenzen, Motive und Charakteristika der neuen U1 snRNP-assoziierten Proteine

Um einen ersten Anhaltspunkt über die mögliche Funktion der potentiellen U1 snRNP Proteine zu erhalten, wurden ihre Aminosäuresequenzen auf bekannte Sequenzmotive hin analysiert. Zwei der Proteine, Nam8p und Npl3p, waren bereits von anderen Arbeitsgruppen studiert worden (siehe unten), allerdings nicht im Zusammenhang mit dem U1 snRNP. Luc7p wurde inzwischen unabhängig in einem genetischen Screen identifiziert und intensiv studiert [154], daher wurde dieses Protein hier nicht weiter untersucht. Die beiden unbekannten Proteine YGR013w-p und YDR240c-p werden hier als Snu71p und Snu56p bezeichnet (für „snurp“-assoziiertes Protein von 71 und 56 kDa). Ihre spezifische Assoziation mit dem U1 snRNP (sowie die U1-Assoziation von Nam8p) konnte eindeutig durch Immunpräzipitation nachgewiesen werden (siehe 4.3.5.2).

MSYKQTITYYP	SRGNLVRNDS	SPYNTTISSE	TNNSSTSVLS	LQGASNVSLG	TTGNQLYMGD	LDPTWDKNTV	70
RQIWASLGEA	NINVRMMWNN	TLNNGSRSSM	GPKNNQGYCF	VDFPSSTHAA	NALLKNGMLI	PNFPNKKLKL	140
NWATSSYSNS	NNSLNNVKSG	NNCSIFVGD	APNVTESQLF	ELFINRYAST	SHAKIVHDQV	TGMSKGYGFV	210
KFTNSDEQQL	ALSEMQGVFL	NGRAIKVGPT	SGQQQHVSGN	NDYNRSSSSL	NNENVDSRFL	SKGQSFLSNG	280
NNNMGFKRNH	MSQFIYPVQQ	QPSLNHFTDP	NNTTVFIGGL	SSLVTEDEL	AYFQPFGTIV	YVKIPVGKCC	350
GFVQYVDRLS	AEAAIAGMQG	FPIANSRVRL	SWGRSAKQTA	LLQQAMLSNS	LQVQQQPGP	LQVQQQPGP	420
STCEAPVLPD	NNVSSTMLPG	CQILNYSNPY	ANANGLGSNN	FSFYSNNNAT	NTQATSLLD	TSSMDLSGTG	490
GQQVIMQGE	AVVNSTNAML	NRLEQGSNGF	MFA				523

Abb. 17: Sequenz des U1 snRNP-spezifischen Proteins Nam8p

Die drei RNA-Bindungsdomänen (RBDs) sind grau unterlegt, die zugehörigen Sequenzmotive RNP-2 (6 Aminosäuren) und RNP-1 (acht Aminosäuren) sind schwarz unterlegt. Die Sequenzen der massenspektrometrisch identifizierten Peptide sind fett gedruckt und unterstrichen. Der C-terminus einer verkürzten Version des Proteins, welche zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet wurde, ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Nam8p besteht aus 523 Aminosäuren und enthält drei RNA-Bindungsdomänen (RBDs) zwischen den Positionen 45-145, 153-243 und 303-487 (Abb. 17). Es konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von Nam8p Spleißdefekte in mutierten selbst-spleißenden Introns in Mitochondrien ausgleichen kann, und daß Nam8p nicht essentiell für vegetatives Wachstum ist [155]. Nam8p ist jedoch essentiell während der Meiose, da es notwendig für das Spleißen einer Meiose-spezifischen prä-mRNA, des *MER2*-Transkriptes ist [156, 157]. *MER2* enthält eine nicht-kanonische 5'-Spleißstelle, die vermutlich keine stabile Basenpaarung mit der U1 snRNA eingehen kann [158]. Prä-mRNA-Spleißen von *MER2* ist abhängig von der Meiose-spezifischen Expression des ebenfalls RNA-bindenden Mer1p Proteins [159]. Es konnte gezeigt werden, daß Mer1p die Wechselwirkung der *MER2*-5'-Spleißstelle mit dem 5'-Ende der U1 snRNA stabilisiert [160]. Wird die 5'-Spleißstelle von *MER2* zu einer kanonischen Sequenz mutiert, so wird *MER2* unabhängig von Mer1p gespleißt. Eine Mutation in der 2. RBD von Nam8p beeinflusst ebenfalls die Spleißreaktion von *MER2* [157]. Die Phänotypen der *nam8*-Mutation wurden teilweise aufgehoben, wenn

das Intron aus dem *MER2*-Gen entfernt wurde. Es ist daher vorstellbar, daß Nam8p als U1 snRNP-Protein mit Hilfe seiner RBDs diese Wechselwirkung zwischen U1 und der 5'-Spleißstelle der prä-mRNA stabilisiert.

MSEAQETHVE	QLPESVVDAP	VEEQHQEPPQ	APD <u>APQEP</u> QV	PQES <u>APQESA</u>	<u>PQEP</u> <u>APQEQ</u>	NDVPPPSNAP	70	
IYEGEESHVS	QDYQEAHQHH	QPPEPQPYYP	PPPPGEHMHG	RPPMHHRQEG	ELSNTRLFVR	PFPLDVQESE	140	
LNEIFGPFGP	MKEVKILNGF	AFVEFEAAES	AAKAIEEVHG	KSFANQPLEV	VYSKLPKRY	RTMKNLPEG	210	
CSWQDLKDLA	<u>RENSLETTF</u>	<u>SVNTRD</u>	FDGT	GALEFPSEEI	LVEAL <u>ER</u> LNN	IEFR <u>GSVITV</u>	<u>ERDNNPPPIR</u>	280
<u>RSNR</u> GGFRGR	GGFRGGFRGG	FRGGF <u>SR</u> GGF	GGPRGGFGGP	RGYGGYSRG	GYGGY <u>SR</u> GGY	GG <u>SR</u> GGYDSP	350	
RGGYDSPRGG	<u>YSR</u> GGYGGPR	NDYGPPRGSY	GG <u>SR</u> GGYDGP	RGDYGPP <u>RDA</u>	YRTR <u>RDAP</u> <u>REFR</u>	SPTR	414	

Abb. 18: Sequenz des mit dem U1 snRNP koisolierten Proteins Npl3p

Npl3p enthält zwei RNA-Bindungsdomänen, die hellgrau unterlegt sind, die Sequenzmotive RNP-2 und RNP-1 sind schwarz, eine C-terminale RGG-Box ist dunkelgrau unterlegt. Vier wiederholte Tetrapeptide (APQE) am N-Terminus, sowie mehrere RS-, SR-, RD- und RE-Dipeptide sind umrahmt. Die Sequenzen der massenspektrometrisch identifizierten Peptide sind fett gedruckt und unterstrichen.

Npl3p (414 Aminosäuren) ist ein bereits mehrfach untersuchtes, RNA-bindendes Protein (Abb. 18). Es gehört zu den wenigen Hefe-Proteinen, deren Struktur eng mit der der hnRNP-Proteine aus höheren Eukaryonten verwandt ist [161]. Diese besitzen, wie Npl3p auch, zwei RBDs in den ersten zwei Dritteln der Sequenz und eine, ebenfalls RNA-bindende, sogenannte RGG-Box am C-Terminus. Für Npl3p wurden eine Vielzahl von Funktionen gezeigt oder postuliert. Es ist beteiligt am Export von mRNA aus dem Kern und besitzt daher die Fähigkeit zwischen Kern und Cytoplasma hin und her zu wandern ([162] und Referenzen darin). Desweiteren wurde eine Beteiligung von Npl3p an der Prozessierung der prä-rRNA, jedoch nicht am prä-mRNA-Spleißen gezeigt [163, 164]. Eine Assoziation von Npl3p mit snRNPs wurde bisher nicht gezeigt. Npl3p enthält einige SR-, DR und ER-Dipeptide, hauptsächlich als Teil der RGG-Domäne. Solche Dipeptide sind charakteristisch für eine ganze Klasse von Spleißfaktoren in höheren Eukaryonten, welche unter anderem an der Erkennung sowie an der Diskriminierung alternativer Spleißstellen beteiligt sind [117]. Diese

MRDIVFVSPQ	LYLSSQEGWK	SDSAKSGFIP	ILKNDLQRFQ	DSLKHIVDAR	NSLSETLLNS	NDDGSIHNSD	70	
QNTGLNKDKE	ASIADNNSAN	KCATSSSRVQ	ELKQFLPISL	DQQIHTVSLQ	GVSSSFSRGQ	IESLLDHCLN	140	
LALTETQSNS	ALKVEAWSSF	SSFLDTQDIF	IRFSKVDEDE	AFVNTLNYCK	ALFAFIRKLH	EDFKIELHLD	210	
LNTKEYVE	DR	TGTIPSVKPE	KASEFYSVFK	NIEDQTDERN	SKKEQLDDSS	TQYKVDNTNL	SDLPSDALDQ	280
LCKDIIIEFRT	KVVSIEKEKK	MKSTYEE	SR	QRHQMKQVFD	QIRKNHSGAK	GSANTEEDT	NMEDEDEEDD	350
TEDDLALEKR	KEERDLEESN	RRYEDMLHQL	HSNTEPKIKS	IRADIMSAEN	YEEHLEKNRS	LYLKELLHLA	420	
NDVHYDHHRS	FKEQFERRDE	EDRAKNGNAK	ELAPIQLSDG	KAISAGKAAA	ITLPEGTVKS	ENYNADKNVS	490	
ESSEHVKIKF	DFKKADHSV	ESSSEDEGYR	ESELPPTKPS	ERSAAEDRLP	FTADELNIRL	TNLKESRYVD	560	
ELVREFLGVY	EDELVEYILE	NIRVNQSKQA	LLNELRETFD	EDGETIADRL	WSRKEFRLGT		620	

Abb. 19: Sequenz des U1 snRNP-spezifischen Proteins Snu71p

SR-, DR- und ER-Dipeptide sind umrahmt, eine mögliche Kernlokalisierungs-Signalsequenz ist grau unterlegt und die Sequenzen der massenspektrometrisch identifizierten Peptide sind fett gedruckt und unterstrichen.

sogenannten SR-Proteine enthalten, im Gegensatz zu Npl3p, extensive repetitive Sequenzen von SR-Dipeptiden. Diese können phosphoryliert werden und der Phosphorylierungsgrad ist entscheidend für die Aktivität dieser Proteine. Kürzlich wurde gezeigt, daß auch die wenigen SR-Dipeptide in Npl3p spezifisch von der Proteinkinase Sky1p phosphoryliert werden [165]. Interessanterweise besitzen die RBDs von Npl3p eine hohe Ähnlichkeit mit denen des humanen SR-Spleißfaktors ASF/SF2 [166, 167].

Snu71p besteht aus 620 Aminosäuren, enthält auch einige SR-, DR und ER-Dipeptide, ansonsten aber keine Sequenzmotive, die auf eine spezifische Funktion dieses Proteins hinweisen (Abb. 19). Die oben genannten Dipeptide finden sich nur unzusammenhängend über die gesamte Sequenz verteilt. Das Protein ist aufgrund eines hohen Gehalts an negativ geladenen Aminosäuren schwach sauer (berechneter pI = 4,78) und enthält einen extrem negativ geladenen Bereich zwischen den Positionen 336 und 375. Möglicherweise befindet sich ein nukleäres Lokalisierungs-Signal (NLS) zwischen den Positionen 298 und 312.

MRPRRRGLAY	HHTKPKGQLS	QGHYPTTSD	GQRRKVGNS	AFQSFDIWN	LDIRSTKKN	AGQFIKGSLL	70
ILPMRTEDKQ	QFDECMDELH	KYISKDILRC	YPQKEQKDEG	MLFYIVLKDF	NILDSCFVLS	VLLAFQKRLW	140
MAPSEKSYFR	VPK NINLTGS	FYLPKNIETG	R GHIITSYRR	EQPSSSIVEV	GFNVVPDFQQ	FQVKACHVSK	210
FMNELSNFFS	QVEFGKCEAN	VINYFKREYN	RTYSQISLAL	YELPLIGDGL	FDIKSYISKT	RPIIETSKAQ	280
MIKHISEMKA	YNEISGLQGD	QFPR QQRPLS	NSPSSNSISS	SQTIEAGATS	YQTQQRHAV	NKPSNVLNSS	350
NRHSGPKTFE	DGRYSEGNKP	GFMTQDEIKQ	HCIGTIKASM	DAVKKKSSYQ	ILKTYVRCPR	QNYIDIVYQN	420
LNDLRSKTNC	NIVVLNLNNL	HESQMWLESL	NTNTYTIFAQ	APHPSTIRVI	SIGGVGEYIV	KALELILNIL	490
EH							492

Abb. 20: Sequenz des U1 snRNP-spezifischen Proteins Snu56p

Die Sequenzen der massenspektrometrisch identifizierten Peptide sind fett gedruckt und unterstrichen.

Snu56p besteht aus 492 Aminosäuren und enthält ebenfalls keine Sequenzmotive, die eine besondere Funktion vermuten lassen (Abb. 20). Rekombinantes Snu56p hat *in vitro* eine schwache RNA-Bindungsaffinität (nicht gezeigt), konsistent damit ist das Protein schwach basisch (berechneter pI = 9,35).

MSTMSTPAAE	QRKLVEQLMG	RDFSFRHNRY	SHQKRDGLGH	DPKI CK SYLV	GE C PYDLFQG	TKQSLGK CPQ	70
M ELTKHKIQY	EREVKQGKTF	PEFERE YLA I	LSR FEVNECNG	QISVALQNLK	HTAEERMK IQ	QVTEELDVLD	140
VR IGLMGQEI	DSLIRADEVS	MGMLQSVKLQ	ELISKRKEVA	KVRNITENV	GQSAQQKLQV	CEV C GAYLSR	210
LD TDRLRLAD H	FLGKI H LGIV	KMREDYDRLM	KNNRTTNASK	TATTLPGRRF	V		261

Abb. 21: Sequenz des U1 snRNP-spezifischen Proteins Luc7p

Zwei mutmaßliche Zinkfinger-Motive vom C₃H- und C₂H₂-Typ sind grau unterlegt, die Zink-koordinierenden Aminosäuren schwarz. Luc7p wurde unabhängig auch von P.Fortes und Mitarbeitern identifiziert (s. Diskussion). Die Sequenzen der massenspektrometrisch identifizierten Peptide sind fett gedruckt und unterstrichen.

Luc7p ist ein Protein mit 261 Aminosäuren. Im ersten und letzten Drittel der Sequenz befinden sich mutmaßliche Zinkfinger-Motive des C₃H und C₂H₂-Typs, mit denen Luc7p möglicherweise mit Proteinen oder RNA wechselwirken kann (Abb. 21).

4.3.5 Funktionelle Charakterisierung der neuen U1 snRNP Proteine

Die neuen, mit dem U1 snRNP koisolierten Proteine (Snu71p, Nam8p, Snu56p und Npl3p) sollten nun näher charakterisiert werden. Zuerst sollte durch eine unabhängige Methode untersucht werden, ob diese Proteine tatsächlich mit dem U1 snRNP assoziiert sind, nicht zuletzt, um die Verlässlichkeit der hier erstmals erprobten Methode zur spezifischen Isolierung von Hefe-snRNPs zu überprüfen. Durch Immunpräzipitation der einzelnen Proteine mit spezifischen Antikörpern und Analyse der Präzipitate wurde untersucht, ob diese Proteine mit (U1) snRNPs assoziiert sind und wie stabil ihre Wechselwirkung mit dem Partikel ist. Die Bedeutung der neuen U1 snRNP-Proteine für das Zellwachstum wurde dann durch Gen-Deletionen studiert. Ihre Funktionen im Spleißprozeß wurden (in Kollaboration mit dem Labor von Prof. M. Rosbash, Waltham, Massachusetts) durch die Analyse mutierter Allele der für diese Proteine kodierenden Gene untersucht, welche im Zusammenhang mit normalerweise folgenlosen Mutationen der U1 snRNA zu synthetisch letalen Wachstums-Phänotypen führen (siehe Diskussion und [153]).

4.3.5.1 Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen Snu71p, Nam8p, Snu56p und Npl3p

Zunächst wurden in Kaninchen polyklonale Antiseren gegen Snu71p, Nam8p, Snu56p und Npl3p erzeugt. Dazu wurden die entsprechenden Gene in einen bakteriellen Expressionsvektor (pGEX-4T1) kloniert. Die gewünschten Proteine wurden dann als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) am N-Terminus in *E.coli* exprimiert und anschließend durch Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose aus dem Bakterien-lysat gereinigt (siehe Material & Methoden, Kapitel 3.2.2.12).

Alle vier Proteine ließen sich exprimieren und aufreinigen (für Nam8p wurde eine C-terminal verkürzte Version des Proteins gewählt) und wurden dann zur subkutanen Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die so gewonnenen polyklonalen Antiseren reagierten alle spezifisch mit dem entsprechenden Protein in gereinigten U1 snRNPs (nicht gezeigt) und konnten daher für spezifische Immunpräzipitationsstudien eingesetzt werden.

4.3.5.2 Snu71p, Nam8p und Snu56p sind spezifisch und stabil mit dem U1 snRNP assoziiert

Durch Radioimmunpräzitations-Assays (RIPAs) sollte nun untersucht werden, ob die neuen Proteine spezifisch mit dem U1 snRNP assoziiert sind. Die Antiseren gegen Snu71p, Nam8p, Snu56p und Npl3p wurden jeweils mit Protein A Sepharose inkubiert, welche spezifisch die im Serum enthaltenen IgG Antikörper bindet. Die Sepharose wurde anschließend gewaschen, um sie von nicht-IgG Bestandteilen des Serums (wie z.B. RNasen) zu befreien. Aliquote der IgG-gekoppelten Sepharose wurden mit Hefeextrakt inkubiert, die Sepharose wurde anschließend aufgeteilt und mit Waschpuffern unterschiedlicher Salzkonzentrationen gewaschen. Kopräzipitierte snRNAs wurden von den Präzipitaten extrahiert und durch Northern-Blot Analyse untersucht (Abb. 22).

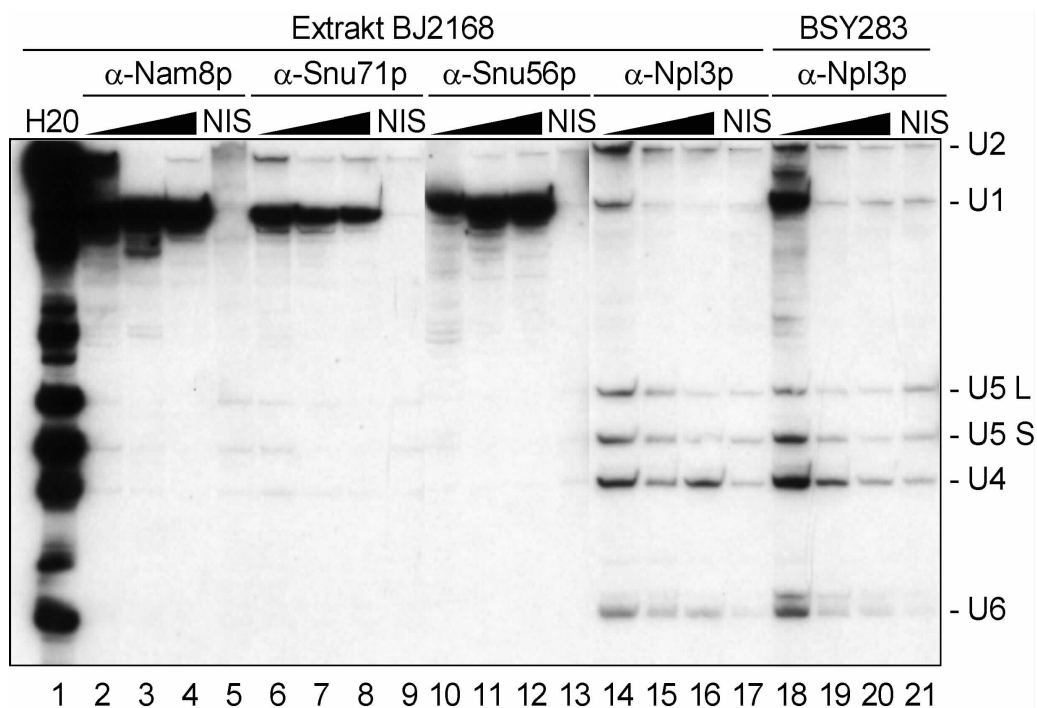


Abb. 22: Nam8p, Snu71p und Snu56p sind spezifisch und stabil mit dem U1 snRNP assoziiert, während Npl3p schwach mit allen snRNPs wechselwirkt

Je 150 µl Hefeextrakt wurden mit 60 µl Protein A Sepharose und den daran gekoppelten Antikörpern gegen Nam8p, Snu71p, Snu56p und Npl3p inkubiert und dann präzipitiert. Die Präzipitate wurden gedritelt und je ein Drittel mit Puffer NET-2 (50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,05 % Nonidet-P40), der 150, 400 oder 700 mM NaCl enthielt, gewaschen. RNAs wurden aus den Präzipitaten extrahiert und dann per Northern Blot mit radioaktiv markierten DNA-Sonden gegen die U2, U1, U5, U4 und U6 snRNAs analysiert. In Spuren 1-17 wurde ein Protease-defizienter Extrakt verwendet (aus Stamm BJ2168), der bezüglich des Spleißprozesses dem Wildtyp entspricht, in Spuren 18-21 Extrakt aus BSY283-Zellen. Spur 1: Kontrollpräzipitation mit dem anti-m₃G-Kappen Antikörper H20. Als Negativkontrollen wurde auch jeweils 50 µl Extrakt mit dem entsprechenden Prä-Immunserum ("NIS") bei 150 mM NaCl inkubiert (Spuren 5, 9, 13, 17, 21). Spuren 2-4: α-Nam8p Serum; 6-8: α-Snu71p; 10-12: α-Snu56p; 14-16 und 18-20: α-Npl3p. Die ansteigende Salzkonzentration im Waschpuffer ist durch Keile markiert. Rechts ist die Identität der snRNAs indiziert.

Die Analyse der Immunpräzipitate zeigte, daß jeweils ähnliche Mengen von U1 snRNA spezifisch mit Antikörpern gegen Nam8p, Snu71p und Snu56p kopräzipitiert wurden.

Die Menge der präzipitierten U1 RNA wurde durch ansteigende Salzkonzentration im Waschpuffer kaum verringert (150, 400 und 700 mM NaCl), was auf eine sehr stabile Assoziation aller drei Proteine mit dem U1 snRNP hindeutet. Mit Ausnahme von etwas U2 snRNA im Falle von Nam8p bei 150 mM Salz (Abb. 22, Spur 2), war keine der anderen spleißosomalen snRNAs im Präzipitat zu detektieren. Da auch in keinem Fall mit den Antikörpern aus den Prä-Immunsera irgendeine snRNA kopräzipitiert wurde (Abb. 22, Spuren 5, 9 und 13), ist die Assoziation von Nam8p, Snu71p und Snu56p mit dem U1 snRNP als spezifisch zu betrachten.

Dagegen konnte die Natur der Assoziation von Npl3p mit UsnRNPs durch dieses Experiment nicht geklärt werden (Spuren 14-21): Npl3p scheint bei 150 mM Salz schwach mit allen UsnRNPs assoziiert (Spuren 14 und 18), wobei sich, in Abhängigkeit vom getesteten Extrakt, eine geringe Präferenz für das U1 snRNP zeigte. So kopräzipitierten die Npl3p-Antikörper mehr U1 snRNP aus dem Extrakt, der zur Isolierung des U1 benutzt wurde (Spur 18; Stamm BSY283), als aus einem Wildtyp-Extrakt (Spur 14). Auch bei anderen getesteten Extrakten zeigte sich eine präferentielle, aber schwache Assoziation von Npl3p mit dem U1 snRNP (nicht gezeigt). Die Antikörper des Prä-Immunserums zeigten ebenfalls eine schwache Präzipitation aller snRNPs (Spuren 17 und 21).

Um zu klären, ob Npl3p im Extrakt überhaupt signifikant mit UsnRNPs assoziiert ist, wurde die Kosedimentation von Npl3p mit snRNPs durch Glyzeringradienten-Zentrifugation von Hefeextrakt analysiert (nicht gezeigt; siehe [153]). Während die UsnRNAs je nach ihrer Assoziation mit snRNP-Partikeln in Fraktionen des Gradienten zu finden waren, die Sedimentationskoeffizienten zwischen 7S (freies U6 snRNP) und 25S ([U4/U6.U5] tri-snRNP) entsprachen, befand sich die Hauptmenge von Npl3p am oberen Ende des Gradienten (2-4S). Geringere Mengen von Npl3p waren aber auch in Fraktionen aller Sedimentationskoeffizienten detektierbar, ohne jedoch einen deutliches Maximum bei 18S aufzuweisen, was dem Sedimentationsbereich des U1 snRNPs entspricht. Dieses Verhalten deutet auf eine Assoziation von Npl3p mit RNP-Partikeln aller möglichen Größen hin, was mit seiner möglichen Rolle als hnRNP-artiges, mRNA-bindendes Protein in Einklang stünde [161]. Eine spezifische Assoziation von Npl3p mit einem bestimmten UsnRNP läßt sich daraus jedoch nicht ableiten.

4.3.5.3 *In vivo* Gen-Deletion ("Knockout") von *SNU71*, *NAM8* und *SNU56*

Snu71p, Nam8p und Snu56p sind stabil mit dem U1 snRNP assoziiert. Da das U1 snRNP essentiell für die prä-mRNA Spleißreaktion ist, könnten auch einzelne seiner Proteinkomponenten essentiell zur Spleißreaktion beitragen. Um dies zu untersuchen, wurde zunächst überprüft, ob die neuen U1 snRNP Proteine essentiell für das vegetative Wachstum der Hefe sind. Für *NAM8* war bereits bekannt, daß es nicht essentiell für vegetatives

Zellwachstum ist [155]. Die Deletion dieses Gens würde es aber evtl. ermöglichen, ein Δ -Nam8p U1 snRNP aufzureinigen und zu untersuchen, ob sich der Verlust des Nam8p Proteins z.B. auf die strukturelle Organisation des U1 snRNPs auswirkt. Über *SNU71* und *SNU56* lagen bezüglich ihrer Bedeutung für das vegetative Zellwachstum keine Informationen vor.

Die Gene von *Snu71p* und *Nam8p* wurden durch homologe Rekombination in einem diploiden (*SNU71*; in Stamm Tr1 a/ α) oder haploiden Stamm (*NAM8*; in Stamm BSY283, welcher das polyhistidin-markierte *Sn1p* exprimiert) mit dem *URA3*-Markergen zerstört (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.5.1.2). Im Falle von *NAM8* wurde so, nach Selektion auf SD-Platten ohne Uracil, der für Uracil auxotrophe Stamm mit der *nam8 Δ ::URA3*-Deletion direkt erhalten (Stamm AGY1).

Für die Untersuchung der *snu71*-Gen-Deletion wurden die Zellen zunächst nach Integration des *URA3*-Markergens selektioniert (Stamm AGY2), zur Sporulation gebracht und einer Tetradenanalyse unterzogen (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.5.1.5). Nur jeweils zwei Sporen, die nicht das Markergen trugen, wuchsen, was auf einen letalen Phänotyp der Deletion von *SNU71* hindeutet (Abb. 23 A). Um zu beweisen, daß einzig die Deletion von *SNU71* für die Letalität verantwortlich ist, wurde der diploide *SNU71/snu71 Δ ::URA3* Stamm (AGY2) mit Plasmid pRS314-*SNU71* transformiert, welches *SNU71* und das *TRP1*-Markergen enthält. Die Tetradenanalyse dieses Stammes (AGY3) ergab mehrfach vier überlebende Sporen (Abb. 23 B), wobei sich stets eine Kosegregation der Marker *URA3* (im *snu71 Δ* Locus) und *TRP1* (auf dem pRS314-*SNU71* Plasmid) nachweisen ließ (nicht gezeigt). Daraus folgt, daß *SNU71* essentiell für das vegetative Wachstum der Hefe ist.

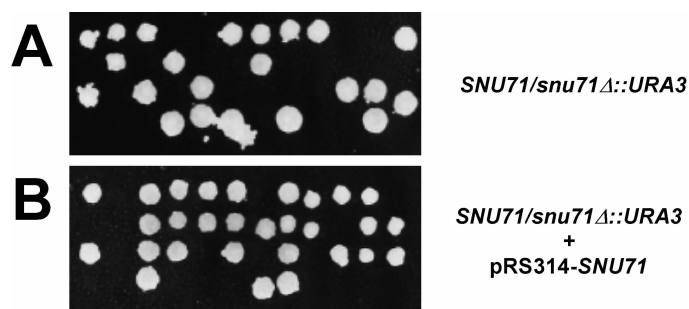


Abb. 23: Der Gen-Deletion von *SNU71* erzeugt einen letalen Wachstumsphänotyp

A: Tetradenanalyse des Stammes AGY2 (*SNU71/snu71 Δ ::URA3*). **B:** Tetradenanalyse des Stammes AGY3 (*SNU71/snu71 Δ ::URA3* + pRS314-*SNU71*).

Für *SNU56* wurde, in Zusammenarbeit mit der Gruppe um Prof. M. Rosbash, eine analoge Strategie unter Verwendung eines Kanamycin-Resistenzgens (*KANI*) benutzt. Diese Arbeiten wurden nicht von mir ausgeführt, zeigten jedoch, daß auch *SNU56* ein essentielles Gen ist [153].

4.3.5.4 Δ Nam8p-U1 snRNP enthält ein neues Protein, Prp42p/Snu65p, und ist im Vergleich zum Wildtyp-U1 snRNP deutlich destabilisiert

Zunächst wurde untersucht, ob die *in vivo* Deletion des Nam8p Proteins einen Effekt auf die Integrität des U1 snRNPs hat. Dazu wurde ein Extrakt aus dem *NAM8*-deletierten Stamm AGY1 hergestellt und für Immunpräzipitations-Experimente benutzt, wie sie bereits in Kapitel 4.3.5.2 beschrieben wurden.

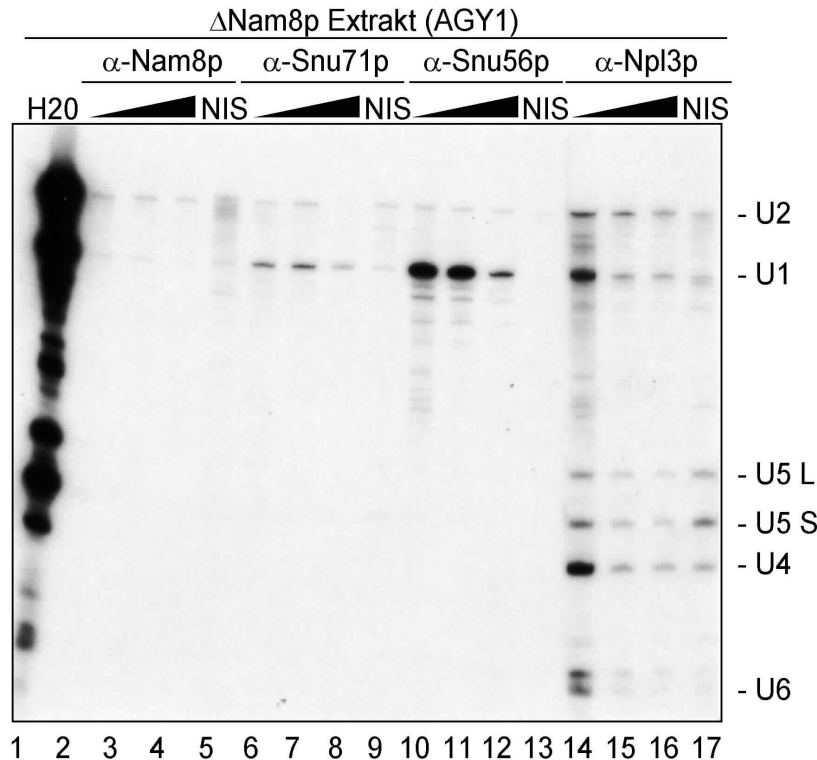


Abb. 24: Die Deletion von Nam8p destabilisiert das U1 snRNP

Immunpräzipitationsexperimente wurden mit dem Extrakt aus Stamm AGY1 (*nam8 Δ ::URA3*) und Antikörpern gegen Nam8p, Snu71p, Snu56p und Npl3p, wie in Abb. 22 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden die Präzipitate bei verschiedenen Salzkonzentrationen gewaschen, die snRNAs extrahiert, auf einem denaturierenden Harnstoffgel elektrophoretisch getrennt und dann per Northern Blot mit radioaktiv markierten Sonden gegen die U1, U2, U4, U5 und U6 snRNAs (je 20×10^6 cpm) analysiert (gezeigt ist ein Autoradiogramm der Blot-Membran). Inhalt der einzelnen Spuren - siehe Beschreibung für die Spuren 1-17 in Abb. 22.

Die anti-Nam8p Antikörper präzipitierten, wie erwartet, kein snRNP aus dem *nam8 Δ ::URA3*-Extrakt (Abb. 24, Spuren 2-4). Interessanterweise zeigte sich, daß die Assoziation von Snu71p und Snu56p mit dem U1 snRNP im Vergleich zur Situation im Wildtyp U1 snRNP, deutlich destabilisiert war (Abb. 24; Spuren 6-8 und 10-12, vergleiche mit Abb. 22). So war Snu71p kaum noch mit dem U1 snRNP assoziiert und Snu56p dissoziierte bei 400 und insbesondere 700 mM Salz vom U1 snRNP ab. Die Deletion von Nam8p hatte dagegen keinen Einfluß auf die Assoziation von Npl3p mit (U1) snRNPs (Spuren 14-16).

Um einen Aufschluß über die Assoziation der übrigen U1 snRNP-Proteine zu erhalten, für die keine spezifischen Antiseren zur Verfügung standen, wurde das Δ Nam8p-U1 snRNP aus dem Stamm AGY1 präparativ aufgereinigt. Diese Aufreinigung erfolgte genau so, wie für das Wildtyp-U1 snRNP beschrieben (Kapitel 4.3.1). Die Analyse der isolierten Proteine zeigte überraschenderweise, daß, zusätzlich zu allen bereits vorher mit dem U1 snRNP isolierten Proteinen, ein neues Protein mit identischem Laufverhalten auf SDS-PAGE Gelen

wie Nam8p mit dem Δ Nam8p-U1 snRNP assoziiert war (nicht gezeigt, siehe aber [153]). Dieses Protein wurde durch massenspektrometrische Analyse, in Zusammenarbeit mit Dr. G. Neubauer und Dr. M. Mann (EMBL, Heidelberg), wie in Kapitel 4.3.3 für die anderen U1 snRNP Proteine beschrieben, identifiziert.

A			
MDKYTALIH	DNFSTLT	LNVSRYPKSLAYW	EKLLNYIVKASAPICKSTEP QLLKLIRCTY SSMLNEFPYL 70
ENYYIDFALL	EYKLG	NVSMSHKIFQ	RGLQAFNQRSLLLWT SYLKFCNNVI SHQQLFKKY ETAEYVGLH 140
FFSGEFWDLY	LEQISSR	CTS	SKKYWNVLRK ILEIPLHSFS KFYALWLQRI DDIMDLKQLS QLTSKDELK 210
KLKIDINYS	G	RKGPYLQDAK	KKLKKITKEM YMVVQYQVLE IYSIFESKIY INYYTSPETL VSSDEIETWI 280
KYLDYTTITLQ	TD	SLTHLNFO	RALLPLAHYD LVWIKYSKWL INSKNDLLGA KNVLLMGLKF SLKKEIETWI 350
LYSVICKLNE	YVLLRN	LLEK	IESSYSNVE NVDDFEIFWD YLQFKTFQON SLYSSRYSDS QSNGLLNKEL 420
FDKVWKR	LSC	KEK	KSGQEIL LNNLVQFYSK DTVEFVEKNI FQKIIEFGWE YYLQNGMFWN CYCRLIYFDT 490
SRSYLDKRQY	IVRKIWP	QID	KKFAQSVLPS LTFECESYFP EEMDTLEEMF TEEP 544
B			
25	KSLAYWEKLLNYIVKASAPICKS-TE----	PQLLKLIRCTYS	61 TPR 1
65	NEFPYLE--NYIIDFALLEYKL--GNVSMSHKIFQ---	RGLQ	99 TPR 2
104	RSILLWTSYLFKFCNNVISHQQLFKKYETAEYVGL		139 TPR 3
143	SGEFWDLYLEQISSRCTS--SK-KYWNVLRKILEIPLHSFS		180 TPR 4
182	FYALWLQRIIDDIMDLK----QL-SQLTSKDELLKCLKIDI		216 TPR 5
275	-ELETWIKYLDYTTITLQTD--SL-THLNFORALLPLAHY		309 TPR 6
310	-DL-VWIKYSKWLINSKND--LL-GAKNVLLMGLKFSK		343 TPR 7
344	KTEIT--KLL-YSV-----ICKL-NEYVLLRNLEKIESSYS		376 TPR 8

Abb. 25: Sequenz des U1 snRNP-spezifischen Proteins Prp42p/Snu65p und Sequenzvergleich der TPR-Repeats

A: Prp42p/Snu65p enthält mindestens acht Wiederholungen des TPR-Motivs (Tetratrico Peptide Repeat); diese sind grau unterlegt. Die Sequenzen der massenspektrometrisch identifizierten Peptide sind fett gedruckt und unterstrichen. **B:** Sequenzvergleich der acht in Prp42p/Snu65p enthaltenen TPRs. Aminosäuren, die in mindestens drei der Sequenzen identisch sind, wurden schwarz, ähnliche Aminosäuren grau unterlegt.

Das neue Protein ist identisch mit Prp42p/Snu65p (ORF YDR235w) und hat 544 Aminosäuren (Abb. 25 A). Prp42p wurde auch aufgrund seiner Sequenzhomologie mit Prp39p entdeckt und untersucht [168]. Snu65p enthält mindestens acht Wiederholungen eines als Tetratrico Peptide Repeat (TPR) bekannten Sequenzmotivs von ca. 34 Aminosäuren (Abb. 25 B). Mehrere Wiederholungen dieses Motivs finden sich auch in Prp39p [168]. Ein TPR-Motiv bildet je ein Paar von amphipathischen α -Helices, die möglicherweise Protein-Protein Wechselwirkungen eingehen können [106]. In Kollaboration mit Dr. B. Séraphin (EMBL, Heidelberg) konnte durch Immunpräzipitation gezeigt werden, daß Prp42p/Snu65p schwach mit dem U1 snRNP assoziiert ist, aus einem *nam8* Δ -Extrakt wird jedoch deutlich mehr U1 snRNP präzipitiert [153]. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, daß Prp42p nur in Abwesenheit von Nam8p mit dem U1 snRNP biochemisch aufgereinigt wird. McLean und Mitarbeiter konnten zeigen, daß Prp42p/Snu65p essentiell für das vegetative Zellwachstum, die Ausbildung des Commitment Complex und somit für die Spleißreaktion ist [168].

Das isolierte Δ Nam8p-U1 snRNP enthielt zwar alle Proteine, die auch im Wildtyp U1 snRNP vertreten sind, jedoch waren zwei von diesen, Snu71p und Snu56p, deutlich weniger stabil mit dem Δ Nam8p-U1 snRNP als mit dem Wildtyp-U1 snRNP assoziiert (siehe Abb.

24). Um die Stabilität der Assoziation der übrigen Proteine zu untersuchen, wurde das Δ Nam8p-U1 snRNP bei einer hohen Salzkonzentration (450 mM KCl) durch Glyzeringradienten-Zentrifugation fraktioniert. Nachfolgend wurden die einzelnen Fraktionen, wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, auf ihren RNA (Abb. 26 A) und Proteingehalt (Abb. 26 B) hin analysiert.

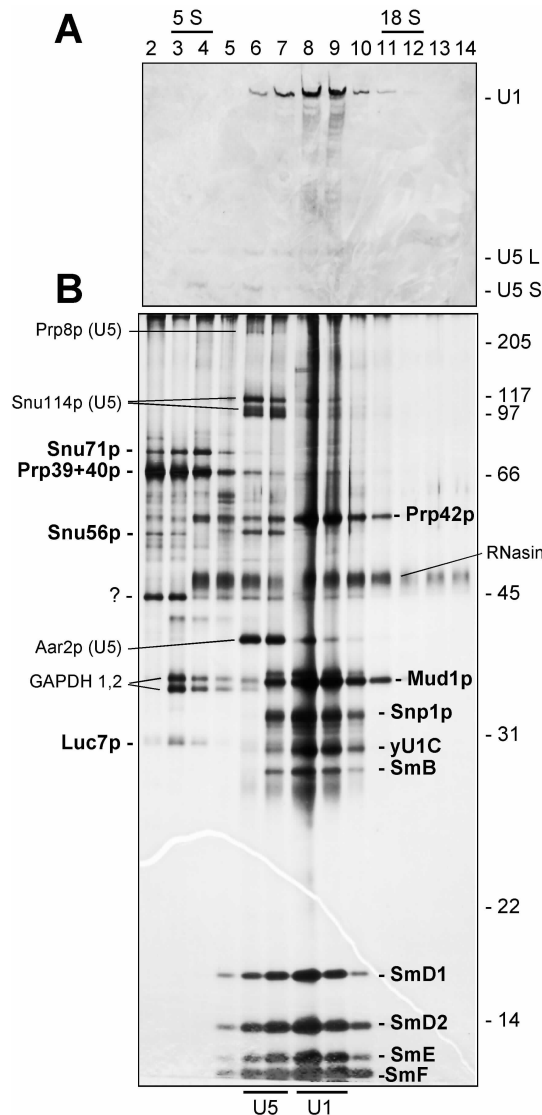


Abb. 26: Die Hefe-spezifischen U1 snRNP-Proteine dissoziieren bei Inkubation des Δ Nam8p-U1 snRNPs in 450 mM KCl von diesem Partikel ab

Δ Nam8p-U1 snRNPs wurden aus AGY1-Zellen gereinigt und auf einem 10-30% Glyzeringradienten, der 450 mM KCl enthielt, zentrifugiert. RNAs (A) und Proteine (B) wurden aus den Fraktionen extrahiert und getrennt durch denaturierende Gelelektrophorese (Harnstoff-Gel für RNAs, SDS-PAGE für Proteine) und nachfolgende Silberfärbung analysiert. Die U1 snRNP-Proteine (inklusive SmB) sind in Fettdruck indiziert, dabei stehen rechts die Proteine, die mit dem deletierten Partikel kosedimentieren, links sind die Proteine indiziert, die vom Partikel abdissoziiert sind. Die U5 snRNP-spezifischen Proteine sind links indiziert (dünn gedruckt). Eine unidentifizierte Proteinbande ist durch ein Fragezeichen gekennzeichnet.

Zum Vergleich wurde analog auch Wildtyp U1 snRNP bei dieser Salzkonzentration untersucht (nicht gezeigt). Dieses Partikel sedimentierte mit allen Proteinen (außer Npl3p) als intaktes 18 S Partikel (dies war selbst bei 700 mM KCl der Fall; nicht gezeigt). Dagegen sedimentierte das Δ Nam8p-U1 snRNP bei 450 mM KCl als 15 S Partikel. Die Analyse der Proteine zeigte wie erwartet, daß Snu71p und Snu56p nicht mit dem U1 snRNP mitsedimentierten, sondern als freie Proteine im oberen Teil des Gradienten verblieben (Abb. 26 B). Darüberhinaus dissoziierten aber auch Prp39p,

Prp40p und Luc7p vom U1 snRNP ab, die übrigen U1 snRNP-Proteine (Mud1p, Snp1p, yU1C sowie die Sm Proteine, inklusive SmB, das sich im Wildtyp-U1 snRNP-Isolat nicht nachweisen ließ), inklusive Prp42p/Snu65p verblieben jedoch stabil an das U1 snRNP gebunden und kosedimentierten in den 15S-Frakturen. Dem Nam8p Protein scheint demnach eine Rolle als Stabilisator des U1 snRNPs zuzukommen. Sein Fehlen bewirkt eine Schwächung der Assoziation zahlreicher U1 snRNP-Proteine bei Salzkonzentrationen (über 450 mM), bei denen das Wildtyp-U1 snRNP noch vollständig intakt ist. Da diese Salzkonzentrationen jedoch nicht physiologisch sind (ca. 150 mM in der Zelle), kommen

diese destabilisierenden Effekte wohl *in vivo* nicht zum tragen, andernfalls hätte die Gen-Deletion von *NAM8* vermutlich letale Folgen.

Es ist interessant, daß die Proteine, die stabil an das Δ Nam8p-U1 snRNP gebunden blieben, bis auf Prp42p/Snu65p genau diejenigen sind, für die Orthologe im humanen U1 snRNP existieren (Mud1p – U1-A; Snp1p – U1-70k; yU1C – U1-C; sowie die Sm Proteine). Man kann daher vermuten, daß diese Proteine den strukturellen Kern des Hefe-U1 snRNPs ausmachen und möglicherweise als Plattform für die Bindung der übrigen, Hefe-spezifischen U1 snRNP-Proteine dienen. Um dies auch unter dem Aspekt der makromolekularen Struktur dieses Partikels zu untersuchen, wurde das 15S U1 snRNP, welches nach Hochsalzbehandlung des Δ Nam8p-U1 snRNPs resultiert, elektronenmikroskopisch analysiert (Abb. 27). Dies wurde so durchgeführt, wie für das Wildtyp-U1 snRNP beschrieben (Kapitel 4.3.2).

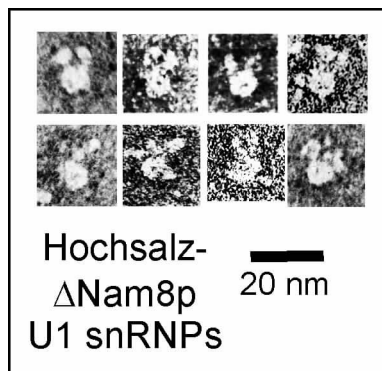


Abb. 27: Das von den Hefe-spezifischen Proteinen befreite Δ Nam8p-U1 snRNP hat eine Struktur, die der des menschlichen Gegenstücks stark ähnelt

Δ Nam8p-U1 snRNPs wurden aus dem Extrakt des Stammes AGY1 aufgereinigt und dann auf einem Glyzeringradienten mit 450 mM KCl im Puffer sedimentiert (vgl. Abb. 26). Die resultierenden 15S Partikel, von denen alle Hefe-spezifischen U1 snRNP-Proteine außer Prp42p/Snu65p abdissoziiert waren, wurden dann, wie in Abb. 14 beschrieben für die Untersuchung im Elektronenmikroskop präpariert und schließlich im Transmission-Elektronenmikroskop analysiert. Der Balken entspricht 20 nm.

Interessanterweise hat dieses Partikel eine Struktur, die in Form und Abmessungen der des menschlichen U1 snRNPs sehr ähnelt. Im Gegensatz zum Wildtyp-Partikel lassen sich einige Beispiele mit der charakteristischen Struktur aus 'core' Domäne und Protuberanzen finden (vgl. Abb. 14 B). Somit scheint die grundsätzliche Struktur des U1 snRNP Partikels evolutionär konserviert zu sein. Die Hefe-spezifischen U1 snRNP-Proteine binden dann vermutlich an diese Grundstruktur, was in der charakteristisch gearteten Struktur des Wildtyp-Hefe U1 snRNPs resultiert (Abb. 14 A). Betrachtet man diese Struktur und vergleicht deren Abmessungen mit der core Struktur bzw. der des salzdeletierten Δ Nam8p-Partikels, so scheint es nur möglich, daß sich die core Struktur in der großen, runden Domäne des Wildtyp-U1 snRNPs befindet. Bei den Aufnahmen des Δ Nam8p-Partikels fällt auf, daß des öfteren an einer Position, die sich zwischen den beiden Protuberanzen befindet, zusätzliche Masse erkennbar ist. Dies könnte auf die ca. 400 zusätzlichen Nukleotide der Hefe-U1 snRNA, oder aber auf das in diesem Partikel, laut Gradientenanalyse, noch enthaltene Prp42p/Snu65p Protein zurückzuführen sein (siehe Abb. 26).

4.3.6 Zusammenfassung

Es konnte eine zuverlässige Methode zur biochemischen Isolierung von Hefe snRNPs entwickelt werden, wie anhand der erfolgreichen Charakterisierung des Hefe-U1 snRNP gezeigt wurde. Die koisolierten Proteine konnten, trotz der geringen darstellbaren Mengen, mit Hilfe der Massenspektrometrie eindeutig identifiziert werden. Das Hefe U1 snRNP ist wesentlich komplexer aufgebaut als sein humanes Gegenstück: Im Gegensatz zum menschlichen U1 snRNP, das sieben Sm Proteine und drei Partikel-spezifische Proteine enthält, ist das Hefe-U1 snRNP ebenfalls mit sieben Sm Proteinen, aber mindestens zehn spezifischen Proteinen assoziiert. Sieben dieser Proteine haben keine bekannten Orthologen im humanen U1 snRNP: Snu71p, Prp39p, Prp40p, Nam8p, Prp42p/Snu65p, Snu56p und Luc7p. Die makromolekulare Struktur des Hefe-U1 snRNPs unterscheidet sich ebenfalls in Form und Größe von seinem humanen Gegenstück. Es konnte aber auch gezeigt werden, daß das Hefe-U1 snRNP im Kern vermutlich den gleichen Aufbau besitzt, wie das menschliche U1 snRNP: Durch die Deletion des nicht-essentiellen Nam8p Proteins wird das Hefe U1 snRNP so destabilisiert, daß alle Hefe-spezifischen U1 snRNP-Proteine (bis auf Snu65p/Prp42p) abdissoziieren und ein in seiner Proteinzusammensetzung dem humanen U1 snRNP entsprechendes Partikel resultiert. Dieses hat auch eine sehr ähnliche elektronenmikroskopische Struktur wie das humane U1 snRNP.

4.4 Biochemische Isolierung des [U4/U6.U5] tri-snRNPs und Charakterisierung neuer tri-snRNP Proteine

Durch die Arbeit am U1 snRNP konnten verlässliche Methoden zur biochemischen Isolierung sowie zur Charakterisierung der Proteinkomponenten eines einzelnen UsnRNPs der Bäckerhefe etabliert werden. Dies gelang, obwohl die Hefe nur sehr geringe Mengen an UsnRNPs enthält. Diese Methode wurde nun auf das größte am Spleißprozeß beteiligte UsnRNP, den [U4/U6.U5] tri-snRNP-Komplex, angewendet. Die Bestandteile des tri-snRNPs machen den Großteil der Komponenten des aktiven Spleißosoms aus. Man kann daher annehmen, daß Teile des tri-snRNPs auch entscheidend zum katalytischen Zentrum des Spleißosoms beitragen. Das katalytisch aktive Spleißosom besteht aus den U5, U6 und U2 snRNPs sowie weiteren, nicht-snRNP Faktoren. Da die U6 snRNA im Vergleich zu den anderen snRNAs die evolutionär am höchsten konservierte Sequenz besitzt, wird allgemein angenommen, daß sie direkt an der Katalyse beteiligt ist. Darüberhinaus weisen zahlreiche Quervernetzungsstudien auf eine enge räumliche Nähe von Proteinen des U5 snRNPs, aber auch der U5 snRNA, zum Zentrum des katalytischen Geschehens im Spleißosom hin (z.B. das Prp8p Protein [65, 169]; siehe auch Einleitung). Zu Beginn dieser Arbeit waren neun tri-snRNP-spezifische Hefeproteine bekannt. Der Vergleich mit dem humanen tri-snRNP, welches mindestens 15 partikel-spezifische Proteine enthält, ließ jedoch erwarten, daß noch weitere tri-snRNP-spezifische Proteine in der Hefe existieren könnten. Die Identifizierung und Charakterisierung solcher tri-snRNP-Proteine war daher eine wesentliche Voraussetzung dafür, die Funktion des tri-snRNPs im Spleißprozeß aufklären zu können. Die Aufreinigung des [U4/U6.U5] tri-snRNPs wurde mit den gleichen Methoden bewerkstelligt, die auch für das U1 snRNP verwendet wurden. Da jedoch das tri-snRNP im Zellextrakt nur etwa in ca. 5-10 fach geringerer Konzentration als das U1 snRNP vertreten ist, mußten größere Mengen an Zellen verwendet werden. Die massenspektrometrische Identifizierung der Proteine erfolgte wiederum in Zusammenarbeit mit Dr. G. Neubauer und Dr. M. Mann (EMBL, Heidelberg).

4.4.1 Präparative Aufreinigung des [U4/U6.U5] tri-snRNPs

Die Aufreinigung des [U4/U6.U5] tri-snRNPs wurde aus Extrakten zweier verschiedener Hefestämme versucht. Zum einen stand ein Hefestamm zur Verfügung, der das U4/U6 snRNP-spezifische Protein Prp4p mit einem zusätzlichen Octahistidin-Peptid exprimiert. Dieser Stamm, W303-Prp4-8xHis, wurde freundlicherweise von Dr. J. Banroques (CNRS, Frankreich) zur Verfügung gestellt [128]. Der zweite Hefestamm, YPF24, exprimiert das U5

snRNP-spezifische Protein Snu114p mit einem Hexahistidin-Peptid und wurde mir von Dr. Patrizia Fabrizio aus unserem Labor zur Verfügung gestellt.

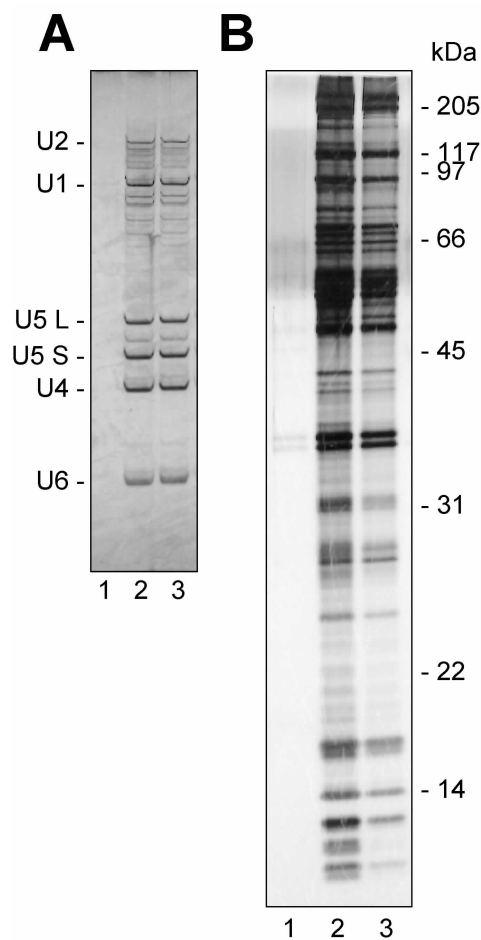


Abb. 28: Isolierung des [U4/U6.U5] tri-snRNPs aus der Mischung aller sn(o)RNPs durch Ni-NTA-Chromatographie

Zunächst wurde die Gesamtmischung aller sn(o)RNPs des Stammes W303-Prp4-8xHis durch H2O-Immunaффinitäts-Chromatographie bei 100 mM KCl gewonnen. Das [U4/U6.U5] tri-snRNP wurde aus dieser Mischung zusammen mit geringen Mengen an U1 und U2 snRNPs durch Ni-NTA-Chromatographie bei 100 mM KCl isoliert. Das m⁷G-Eluat wurde dazu über eine 0,5 ml Ni-NTA-Agarose-Säule geleitet. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch 8 x 1,5 ml Puffer D100 mit 10 mM Imidazol gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 8 x 1 ml Puffer D100 mit 50 mM Imidazol eluiert. RNAs und Proteine aus 100 µl der letzten Waschfraktion (Spuren 1) und je 75 µl der beiden ersten Eluatfraktionen (Spuren 2 und 3) wurden extrahiert, durch denaturierende PAGE aufgetrennt (**A**: RNAs im Harnstoffgel; **B**: Proteine im SDS-Gel) und mit Silber gefärbt. In **A** sind die isolierten snRNAs bezeichnet, ihre Identifikation erfolgte durch Northern Blot (nicht gezeigt). In **B** sind die Positionen von Protein-Molekulargewichtsmarkern angegeben.

Die Aufreinigung des tri-snRNPs erfolgte mit leichten Abänderungen wie bereits für das U1 snRNP beschrieben (Kapitel 4.3.1). Zum einen mußten wegen der niedrigeren Mengen an tri-snRNPs in der Zelle (im Vergleich zu U1 snRNPs) wesentlich größere Mengen an Zellen und somit Extrakt verwendet werden. Um genügend gereinigtes Material für die Identifizierung der tri-snRNP-Proteine zu erhalten, wurden 680 g Zellen (W303-Prp4-8xHis)

aufgearbeitet (beim U1 snRNP genügten 180 g BSY283). Desweiteren wird das [U4/U6.U5]tri-snRNP nur bei niedrigen Salzkonzentrationen effizient auf der anti-m₃G-cap-Immunaффinitätssäule gebunden [123]. Daher wurde der Extrakt im letzten Präparationsschritt gegen Puffer D mit 100 mM KCl dialysiert; auch in den nachfolgenden Chromatographieschritten wurde diese Salzkonzentration verwendet. Um die Chromatographie in einem Schritt durchführen zu können, wurden 5 ml H2O-Sepharose (statt 1,5 ml) in einer Glassäule mit 2 cm Durchmesser verwendet. Im letzten Reinigungsschritt, der Glyzeringradienten-Zentrifugation, wurde die Salzkonzentration auf 200 mM KCl erhöht, um unspezifisch koisolierte Proteine effizienter abzutrennen, als bei 100 mM Salz möglich ist. Sedimentationsverhalten und Proteinzusammensetzung des [U4/U6.U5] tri-snRNPs wurden durch die Behandlung mit 200 mM Salz nicht verändert. Die Proteinkomposition war ferner unabhängig davon, welcher Stamm zur Isolierung verwendet wurde.

Im H2O-Immunaффinitäts-Chromatographieschritt wurden 1,7 mg Gesamt-snRNPs erhalten, nach der Ni-NTA-Chromatographie enthielt das tri-snRNP-haltige Eluat ca. 80 µg

Proteine. Die RNA- und Proteinanalyse des Ni-NTA-Eluates (Abb. 28 A und B) zeigte, daß der Hauptbestandteil dieses Eluats das [U4/U6.U5] tri-snRNP war. Das Eluat enthielt jedoch auch geringe Mengen an U1, sowie Spuren an U2 snRNPs. Im silbergefärbten SDS-Gel ließen sich etwa 45 Proteine detektieren (Abb. 28 B). Das Eluat wurde zur endgültigen Reinigung des [U4/U6.U5] tri-snRNPs einer Glyzeringradienten-Zentrifugation unterworfen.

4.4.1.1 Glyzeringradienten-Zentrifugation des [U4/U6.U5] tri-snRNP Eluats

Das Ni-NTA-Eluat wurde in drei Aliquote aufgeteilt und auf Glyzeringradienten (10-30%) zentrifugiert, die eine Pufferlösung mit 200 mM KCl enthielten (Puffer G: 20 mM Hepes/KOH, pH 7,9; 0,2 mM EDTA; 1,5 mM MgCl₂; 10-30% Glyzerin; je 0,5 mM DTT und PMSF). Dadurch wurde das 25S [U4/U6.U5] tri-snRNP von U1 und U2 snRNPs, die bei ca. 18S sedimentieren, zumindest partiell getrennt. Unspezifisch koisolierte Proteine verblieben am oberen Ende des Gradienten. Die RNA- und Protein-Analytik aller Gradientenfraktionen ist in Abb. 29 A (RNAs) und B (Proteine) gezeigt.

Die koisolierten U1 und U2 snRNAs sedimentierten in Fraktionen, die einem Sedimentationskoeffizienten von ca. 18S entsprechen (Abb. 29 A). Die U5 L, U5 S, U4 und U6 snRNAs kosedimentieren alle gemeinsam in einem relativ großen Bereich zwischen 18S und 28S, jedoch mit einem deutlichen Maximum bei ca. 23-25S (Fraktionen 14 und 15). Dies deutet darauf hin, daß alle diese snRNAs in einem einzigen snRNP-Partikel dieser Größe assoziiert sind. Es lassen sich nur sehr wenig U4, U5 und U6 snRNAs in den Fraktionen 5-10 (7-15S) ausmachen, die den freien U5, U4/U6 oder U4 und U6 snRNPs entsprechen könnten. Daher kann man annehmen, daß das [U4/U6.U5] tri-snRNP unter den verwendeten Bedingungen stabil ist und nicht in seine Untereinheiten dissoziiert. Das Sedimentationsverhalten des isolierten [U4/U6.U5] tri-snRNPs entspricht dem bei der Zentrifugation von Gesamtextrakt beobachteten (vergl. Abb. 52 A). Auch wenn U1, U2 und [U4/U6.U5] tri-snRNPs nur teilweise voneinander abgetrennt werden konnten, wurden dennoch Fraktionen erhalten, die im wesentlichen reine [U4/U6.U5] tri-snRNPs enthielten (Abb. 29 , Fraktionen 15 und 16).

Die gelelektrophoretische Analyse der aus den Gradientenfraktionen isolierten Proteine ist in Abb. 29 B gezeigt. 34 Proteinbanden mit Massen von ca. 10 bis über 200 kDa kosedimentierten mit snRNP-Komplexen in Fraktionen, die Sedimentationskoeffizienten zwischen 16S und 28S entsprechen. Dabei läßt sich eine Anzahl von Proteinen ausmachen, die deutlich mit dem Maximum der zum tri-snRNP gehörenden snRNAs bei 25S kosedimentiert (Fraktionen 14 und 15; z.B. Banden 1-6, 11-13). Eine weitere Gruppe von Proteinen hat ein Sedimentationsmaximum in den 18S-Fraktionen, die den U1 und U2 snRNPs entsprechen (Fraktion 13; z.B. Banden 7 und 8, 15-18). Die apparenten Molekulargewichte dieser letzteren Proteine stimmen mit mehreren der U1 snRNP-spezifischen Proteine überein (vergleiche Abb. 15). Bei den kleinen Proteine (9-18 kDa) könnte es sich um die den U1, U2, U4 und U5

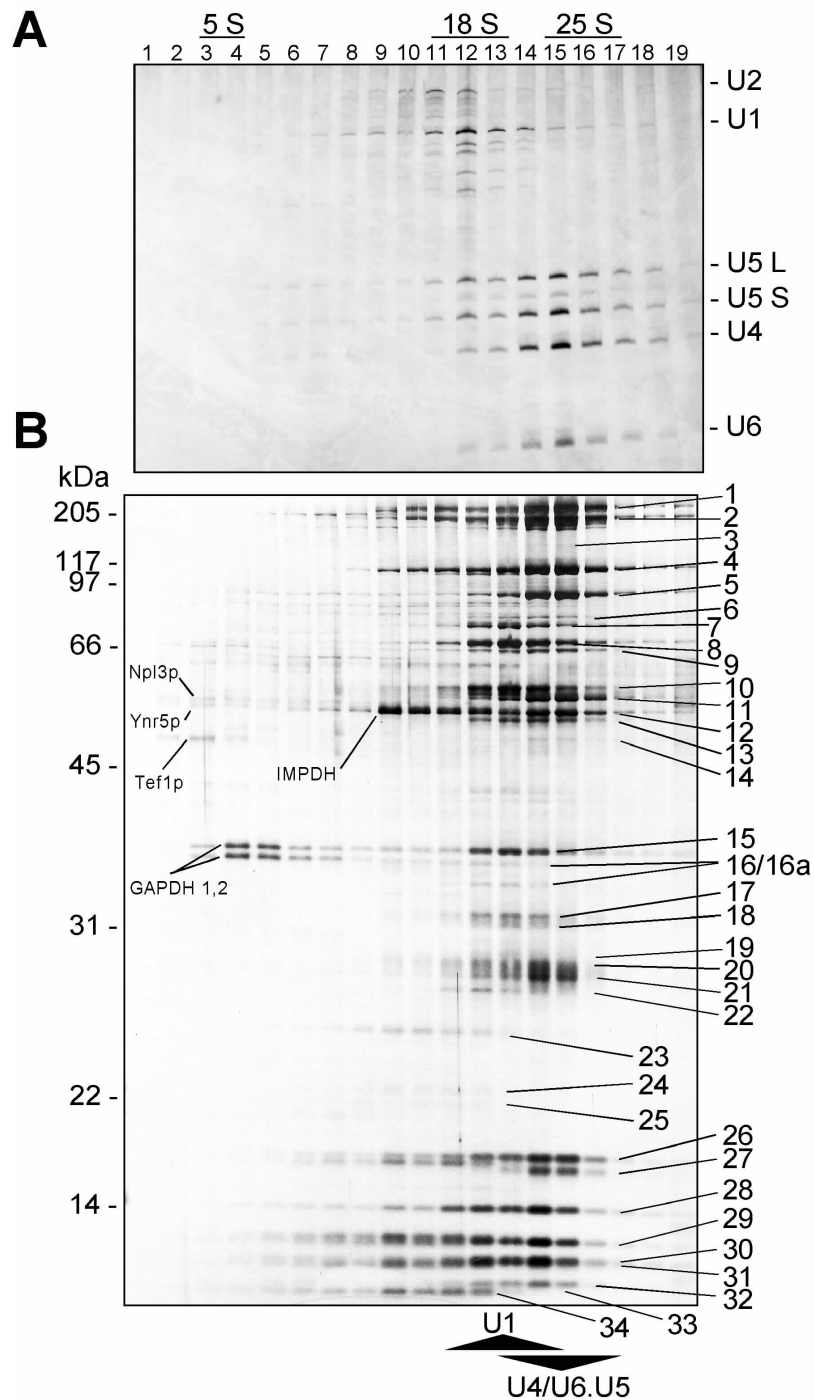


Abb. 29: Glyzeringradienten-Zentrifugation des [U4/U6.U5] tri-snRNP-haltigen Ni-NTA-Eluats

Das Ni-NTA-Eluat der [U4/U6.U5] tri-snRNP Aufreinigung wurde auf einem 10-30% Glyzeringradienten zentrifugiert (24h, 29000 U/min). Die Gradientenlösung wurde anschließend von oben in 19 Aliquote (je 650 µl) fraktioniert. RNAs (A) und Proteine (B) wurden aus jeder Fraktion extrahiert, durch denaturierende Gelelektrophorese (RNAs: Harnstoff; Proteine: SDS) aufgetrennt und im Gel mit Silber angefärbt. A: Die Identität der snRNAs ist rechts angezeigt. Die U5L, U5S, U4 und U6 snRNAs kosedimentieren in den Fraktionen 12-16, mit einem Maximum in Fraktion 15 (25S). Die U1 und U2 snRNAs sedimentieren mit einem Maximum bei 18S (Fraktion 12). B: In den Fraktionen 12-16 finden sich 34 prominente Proteinbanden mit apparenten Molekulargewichten von ca. 10 bis über 200 kDa (die Positionen von Molekulargewichtsmarkern sind links angegeben). Sechs Proteinbanden kosedimentieren nicht mit snRNPs (Fraktionen 1-10; diese Proteine wurden als Npl3p, Ynr5p, Tef1p, IMPDH und GAPDH 1 und 2 identifiziert). Die Numerierung der Proteinbanden erfolgte entsprechend Abb. 30.

snRNPs gemeinsamen Sm Proteine handeln. Im Einklang mit dieser Annahme kosedimentieren sie mit snRNPs in beiden Sedimentationsmaxima (18S und 25S; Banden 26 und 28-32).

Zusätzlich finden sich in diesem Molekulargewichtsbereich weitere Proteine (Banden 27, 33 und 34), von denen einige mit dem 25S tri-snRNP kosedimentieren (z.B. Bande 27). Andere Proteine sind zwar in Fraktionen mit snRNPs vorhanden, jedoch auch in Gradientenfraktionen zwischen 7S und 15S detektierbar, die offenbar keine snRNA enthalten (z.B. Bande 34). Im diesem Teil des Gradienten (Spuren 5-8) könnten RNA-freie Oligomere der kleinen Proteine sedimentieren, denn Proteine dieser geringen Masse würden, in freier Form, kaum in den Gradienten hinein sedimentieren und etwa in den Fraktionen 1-3 verbleiben.

Am oberen Ende des Gradienten (Fraktionen 1-5), aber auch in Fraktionen, die etwa 8-12S entsprechen, finden sich einige Proteine, die offenbar nicht stabil mit den [U4/U6.U5] tri-snRNPs oder U1 und U2 snRNPs assoziiert sind. Hierbei handelte es sich vermutlich um unspezifisch koisolierte Kontaminanten. Dennoch wurden diese Proteine nicht bei der massenspektrometrischen Analyse ausgespart, da es sich hierbei auch um schwach assoziierte tri-snRNP-Proteine handeln könnte, die während der chromatographischen Schritte bei 100 mM Salz stabil assoziiert sind, bei der Gradientenzentrifugation (200 mM Salz) jedoch abdissoziieren.

4.4.2 Massenspektrometrische Analyse der Proteine des [U4/U6.U5] tri-snRNPs

Um genügend Material zur massenspektrometrischen Identifikation der isolierten Proteine zu erhalten, wurden die Proteine aus den Gradientenfraktionen vereinigt, die die Hauptmenge an [U4/U6.U5] tri-snRNPs enthielten (Fraktionen 13-16). Dadurch wurde das tri-snRNP nachträglich wieder mit U1 und U2 snRNPs 'verunreinigt', die zum Teil ebenfalls in diesen Fraktionen sedimentierten. Aus verschiedenen Gründen sollte es aber später möglich sein, für jedes identifizierte Protein eine eindeutige Zuordnung zu einem dieser snRNPs zu treffen. Zum einen war durch die Gradienten-Analyse bekannt, mit welchem snRNP das entsprechende Protein kosedimentiert. Sollten bereits bekannte snRNP-Proteine identifiziert werden, so konnte auf veröffentlichte Daten über ihre Assoziation zurückgegriffen werden. Die Assoziation neu identifizierter Proteine mit snRNPs sollte durch Immunpräzipitationsexperimente untersucht werden.

Die Gradientenfraktionen wurden zunächst extrahiert und die Proteine aus den Fraktionen 13-16 (in denen das tri-snRNP sedimentiert) wurden vereinigt. Ebenso wurde mit Proteinen aus den Fraktionen am oberen Ende des Gradienten (0 - ca. 7S) sowie dem intermediären Bereich (ca. 8-16S) verfahren. Um eine möglichst optimale Auftrennung der Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten zu erreichen, wurden die Proteine durch SDS-PAGE auf einem Gel aufgetrennt, das aus einem oberen Teil mit 11,5 % und einem unteren Teil aus 13% Polyacrylamid bestand. Die Proteinbanden wurden anschließend mit sensitivem (kolloidalem) Commassie-Blau angefärbt. Abb. 30 zeigt nur die Spur, welche die

Proteine der tri-snRNP-haltigen Fraktionen (13-16) enthält. 34 Banden aus dieser Spur, sowie einige prominente Proteinbanden aus den anderen Sedimentationsbereichen des Gradienten (0-7S bzw. 8-16S) wurden ausgeschnitten und in Zusammenarbeit mit Dr. G. Neubauer und Dr. M. Mann (EMBL, Heidelberg) massenspektrometrisch analysiert.

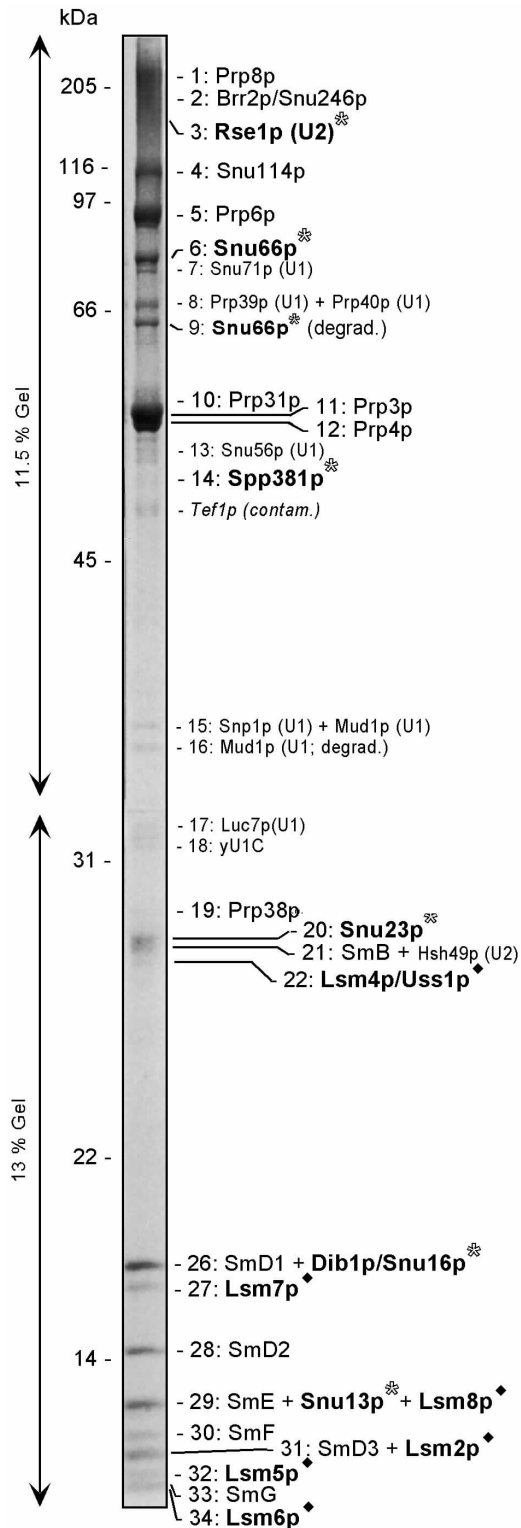


Abb. 30: Vereinigte Proteine der tri-snRNP-haltigen Gradientenfraktionen (18-28S) wurden durch Massenspektrometrie identifiziert

Proteine aus den 18-28S Fraktionen mehrerer Gradientenröhrchen (entspr. Spuren 13-18 aus Abb. 29) wurden vereinigt und auf einem 60 cm langen SDS-Gel aufgetrennt, das im oberen Bereich 11,5 und im unteren Bereich 13 % Acrylamid enthielt. Die Proteine wurden dann mit Kolloidal-Commassie-Blau angefärbt. Insgesamt wurden 34 Banden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Die Identität der gefundenen Proteine ist rechts angegeben und die Banden sind zusätzlich nummeriert (vgl. Abb. 29 B). Links sind die Positionen von Molekulargewichtsmarkern im Gel angegeben. U1 und U2 snRNP-Proteine sind in Klammern indiziert, alle anderen Proteine außer Tef1p sind tri-snRNP-Proteine. Neu identifizierte Proteine sind fett gedruckt und mit einem Stern indiziert. Lsm Proteine sind ebenfalls fett gedruckt und mit einer Raute indiziert.

Mehrere Banden enthielten Mischungen aus Proteinen oder Proteinabbauprodukten. Daher mußte für viele Banden, insbesondere bei den kleinen Proteinen, eine Kombination aus MALDI und Nano-ES Tandem-Massenspektrometrie angewendet werden. Bei den kleinen zur Verfügung stehenden Proteinmengen konnte nur so eine eindeutige Zuordnung der Peptide und Identifizierung der zugehörigen Proteine gewährleistet werden. Alle analysierten Peptide/Proteinbanden konnten so eindeutig bekannten oder aus dem Hefegenom ableitbaren Proteinen zugeordnet werden (zur Identität der einzelnen Proteine siehe Abb. 30).

Die Proteine aus den Gradientenfraktionen zwischen 0 und 16S erwiesen sich als nicht-snRNP assoziierte Kontaminanten (siehe Abb. 29). Darunter befanden sich

bekannte Enzyme aus biochemischen Synthesewegen (z.B. Inosinmonophosphatdehydrogenase, IMPDH), aber auch Proteine, die an zentralen Prozessen in der Zelle beteiligt sind (Tef1p, der an der Proteinsynthese beteiligte Elongationsfaktor 1 α). Desweiteren fand sich hier auch das bereits mit dem U1 snRNP koisolierte Npl3p (siehe Kapitel 4.3.3), das schwach mit allen snRNPs assoziiert ist (siehe Abb. 22). Ein weiteres in diesem Gradientenbereich identifiziertes Protein, Ynr5p, enthält zwei RNA-Bindungs-Domänen. Eine Wechselwirkung mit snRNPs erschien daher möglich und sollte näher untersucht werden (siehe Kapitel 4.4.6).

In den vereinigten (tri-snRNP-) Proteinen der 18-27S Gradientenfaktionen wurden insgesamt 37 verschiedene Proteine identifiziert. Darunter fanden sich acht bekannte U1 snRNP-Proteine (Snu71p, Prp39p, Prp40p, Snu56p, Mud1p, Snp1p, yU1C und Luc7p), sowie ein bekanntes U2 snRNP-spezifisches Protein, Hsh49p [100].

Unter den restlichen 28 Proteinen fanden sich die sieben gemeinsamen core Sm Proteine, inklusive dem im U1 snRNP-Isolat nicht identifizierten SmB (siehe Kapitel 4.3.3). Zwei Proteine, Lsm4p/Uss1p und Lsm8p, sind spezifisch mit dem U6 snRNP assoziierte Sm-ähnliche Proteine, für die bereits eine Assoziation auch mit dem [U4/U6.U5] tri-snRNP gezeigt wurde [79, 103]. Es konnten vier weitere Sm-ähnliche Proteine identifiziert werden: Lsm2p, Lsm5p, Lsm6p und Lsm7p.

4.4.2.1 Sm-ähnliche (Lsm) Proteine im [U4/U6.U5] tri-snRNP

Im Gegensatz zu den U1, U2, U4 und U5 snRNAs, die während ihrer Reifung im Cytoplasma mit den gemeinsamen Sm core Proteinen assoziieren und dann als core-snRNPs in den Kern reimportiert werden, ist die U6 snRNA nicht mit diesen Proteinen assoziiert und verläßt wohl auch nie den Zellkern [22]. Seit einiger Zeit gibt es jedoch Hinweise darauf, daß das U6 snRNP stattdessen spezifisch mit Sm-ähnlichen (engl.: like-Sm – Lsm) Proteinen assoziiert ist: Lsm3p, Lsm4p und Lsm8p [78, 79, 103]. Die Depletion dieser Proteine erzeugt einen letalen Phänotyp und führt zu einem drastischen Verlust der U6 snRNA. Im Hefegenom lassen sich noch sechs weitere Lsm Proteine identifizieren: Lsm1p, Lsm2p, Lsm5p, Lsm6p, Lsm7p und Lsm9p [39]. Eine direkte Assoziation dieser Proteine mit snRNPs ist jedoch bislang nicht demonstriert worden. Ebenso war bislang unklar, ob das U6 snRNP und auch das tri-snRNP (in Analogie zu den kanonischen Sm Proteinen) ebenfalls mit insgesamt sieben Lsm Proteinen assoziiert sind.

Sechs der Lsm Proteine konnten in den vereinigten tri-snRNP-Gradientenfaktionen identifiziert werden, nämlich Lsm2p, Lsm4p, Lsm5p, Lsm6p, Lsm7p und Lsm8p (Kapitel 4.4.2). Ein weiteres Lsm Protein, Lsm3p, dessen Assoziation mit dem tri-snRNP bereits demonstriert worden war [78], konnte hier nicht identifiziert werden. Da kleine Proteine oft nur ein einziges massenspektrometrisch messbares Peptid ergeben, könnte Lsm3p in der

massenspektrometrischen Analyse übersehen worden sein, insbesondere wenn es sich in einer Mischung mit anderen Proteinen befand.

Zusammen mit den veröffentlichten Daten [78, 79, 103], legen es die hier erhaltenen Ergebnisse nahe anzunehmen, daß tatsächlich sieben Lsm Proteine (Lsm2-Lsm8) mit dem tri-snRNP assoziiert sind (siehe Abb. 31 für einen Sequenzvergleich dieser sieben Lsm Proteine). Lsm1p und Lsm9p wurden nicht im tri-snRNP-Isolat identifiziert. Zwar könnte ihre Anwesenheit, wie die von Lsm3p, übersehen worden sein, jedoch konnten auch in zwei anderen Studien [170, 171] keine Hinweise auf die Assoziation von Lsm1p und Lsm9p mit snRNPs gefunden werden. Die Assoziation der Proteine Lsm2-8p mit den U6, U4/U6 und [U4/U6.U5] tri-snRNPs konnte in diesen zwei Studien unabhängig durch Immunpräzipitation gezeigt werden. Kürzlich wurden auch sieben menschliche Lsm Proteine identifiziert und ihre Assoziation mit der U6 snRNA detailliert untersucht [172].

Das Sedimentationsverhalten der Lsm Proteine im Ni-NTA Eluat der tri-snRNP Präparation (Abb. 29) wirft jedoch einige Fragen auf. Die kleinen Proteine mit Molekulargewichten zwischen 8 und 18 kDa (hauptsächlich Sm und/oder Lsm Proteine; nur Sm B und Lsm4p haben größere apparente Molekulargewichte) sedimentieren in einem breiten Bereich des Gradienten. Sie kosedimentieren nicht nur mit snRNP-Komplexen, sondern befinden sich als Proteinkomplexe auch in nahezu RNA-freien Fraktionen zwischen 0 und 12S (am oberen Ende des Gradienten). Diese Proteinkomplexe sind in ihrer Zusammensetzung offenbar inhomogen: Je nach Sedimentationswert scheinen hier unterschiedlich zusammengesetzte Komplexe aufgetrennt zu werden (siehe z.B. Bande 34). Es besteht die Möglichkeit, daß diese Proteinkomplexe tatsächlich freie U4/U6 snRNPs darstellen, die wegen ihrer Assoziation mit dem Prp4p Protein mit dem tri-snRNP koisoliert wurden. Allerdings wurden die gleichen Proteinkomplexe auch in Gradienten des tri-snRNP-Isolates detektiert, das über das Polyhistidin-fusionierte Snu114p gewonnen wurde. Da Snu114p nicht Teil des U4/U6 snRNPs ist, sollte dieses auch nicht über die Ni-NTA-Säule isoliert werden. Ebenso ist eine Isolierung des freien U6 snRNPs auszuschliessen, da dieses nicht durch den H20-Antikörper im ersten Chromatographieschritt gebunden wird.

Aufgrund der teils sehr ähnlichen Migration im SDS-Gel läßt sich nur unzureichend definieren, welche Bande zu welchem (Sm oder Lsm) Protein gehört. Zur exakten Identifizierung der Banden sind spezifische Antikörper notwendig, die leider nicht zur Verfügung standen. Die Untersuchungen am U1 snRNP (Kapitel 4.3.1) und dem core U2 snRNP [173] zeigen jedoch, daß die kanonischen Sm Proteine stabil an die U1 und U2 snRNAs binden. So kosedimentieren die Sm Proteine exakt und in homogener Zusammensetzung mit den U1 und U5 snRNPs (siehe Abb. 13). Aus detaillierten Studien der menschlichen Sm Proteine ist darüberhinaus bekannt, daß die Sm Proteine als komplettes Heptamer stabil an die snRNAs binden [40]. Die menschlichen Lsm Proteine können dagegen

auch RNA-freie Heptamere bilden [172]. Daher liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei den hier beobachteten RNA-freien Protein-Komplexen um die Lsm und nicht um die Sm Proteine handelt. Die Lsm Proteine könnten nur lose an die U6 snRNA binden (siehe [79, 171]) und während der Glyzeringradienten-Zentrifugation von den tri-snRNPs abdissoziiert sein

Sm Motiv 1		
Lsm2p	MLFFSFFKTLVDQEVVVEIKNDIEIKGTLQSVDOFLNKKIDNISCTDEK-----KYPH	53
Lsm3p	METPLDLKLNLDERVYIKLKGARTLVGTLOAFDSHCNVLSDAVETIYQLN----NEELSES	59
Lsm4p	MLPLYLTNAKGQOMOEIKNCEIIOGILTNVDNWMNLTLSNVTEYSESAINSEDNAESSK	62
Lsm5p	MSLPETLPLEVIDKTINCKVLIVLQSNREFEGLTVGFDDEVNVLLEDAVEWLIDP--EDSRNEKVM	65
Lsm6p	MPNKQRRSNPFNNAQDAITRKYGIAQYKONKORLLVMGKASTEGSVTT-----BFLS	54
Lsm7p	MHQHRSQRKKFEGPKREATILDPAKYKDSKIRVKLMGCKLVIQVILKGYDOLMNLVDDTVEYMSNPDDENNELISK	77
Lsm8p	MDQQAAYSTPYKKNTLSCTMSATLKDYLNKRVTILKVDCECLIASNGFDEKNTNLFITNVFNRIISK-----BICKAQL	74
Sm Motiv 2		
Lsm2p	LGSVRNIEIRGSTVRYVYLNKNMVDITNLLQDATRREVMTERK	95
Lsm3p	ERRCEMVEIRGDTVTIISTPSEDDDGAVEI	89
Lsm4p	AVKLNETVIRGTFIKFIKLQDNIIDKVKQQINSNNNSNGPGHKRYNNRDSNNNRGNYNRRNNNGNSNRRPYSQNR	141
Lsm5p	QHHGRMLLSGNNIATIVPGGKKTPTAL	90
Lsm6p	DIICKTVNVKLASGLIYSGRLESIDGFMNVALSSATEHYESNNNNLLNKFNSDVFLRGTVQVMYISEQKI	123
Lsm7p	ARKLGLTVIRGTLVLSLSSAEGSDVLYMQK	107
Lsm8p	LRGSEIALVGLIDAENDDSLAPIDEKKVPMLKDTKNKIEHVIWEKVYESKTK	128
Lsm4p	QYNNSSNSNNINSINSINNQNMMNGLGGSVQHHSFSSSPQKVEF	187

Abb. 31: Sequenzvergleich der sieben im [U4/U6.U5] tri-snRNP enthaltenen Sm-ähnlichen Lsm Proteine

Das [U4/U6.U5] tri-snRNP enthält neben den kanonischen Sm Proteinen (die den U1, U2, U4 und U5 snRNPs gemeinsam sind) sieben Sm-ähnliche (like-Sm - Lsm) Proteine. Identische Aminosäuren in mindestens drei Sequenzen sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau unterlegt. Die beiden konservierten Sequenzmotive Sm1 und Sm2 sind eingerahmt. Die massenspektrometrisch identifizierten Peptide sind fett gedruckt und unterstrichen.

4.4.2.2 Identifikation neuer [U4/U6.U5] tri-snRNP-spezifischer Proteine

In den vereinigten 18-28S Gradientenfractionen konnten desweiteren acht Proteine als bereits bekannte tri-snRNP-assoziierte Proteine identifiziert werden: Prp8p, Brr2p/Snu246p, Snu114p, Prp6p, Prp31p, Prp3p, Prp4p und Prp38p (siehe Tab. 3). Damit konnten hier bis auf das Prp18p Protein alle bekannten tri-snRNP Proteine nachgewiesen werden. Um die Abwesenheit von Prp18p näher zu untersuchen, wurden die Proteine eines zu Abb. 29 analogen Glyzeringradienten im Western Blot mit Antikörpern gegen Prp18p analysiert. Prp18p konnte so eindeutig am oberen Ende des Gradienten identifiziert werden (nicht gezeigt). Dieses Protein ist nur schwach mit dem tri-snRNP assoziiert [96] und dissoziierte wahrscheinlich bei der Zentrifugation des tri-snRNPs in 200 mM Salz vom Partikel ab. Außer Lsm3p waren also alle bekannten tri-snRNP Proteine in dem Ni-NTA-Eluat vorhanden. Dies ist ein guter Hinweis dafür, daß das tri-snRNP als intaktes Partikel aufgereinigt wurde.

Bei den sieben übrigen Proteinen, die in den vereinigten tri-snRNP-haltigen Gradientenfractionen identifiziert wurden, handelt es sich um folgende Proteine oder Genprodukte: Rse1p, YOR308c-p, YBR152w-p, YDL098c-p, Dib1p, YEL026w-p und YIR005w-p. Zunächst wurde analysiert, ob ihre Sequenzen Motive enthalten, die eine mögliche Funktion vorhersagen könnten. Dib1p [174] und Rse1p [175] waren schon

untersucht worden (eine Beteiligung von Rse1p am prä-mRNA Spleißen konnte gezeigt werden), jedoch war keine Assoziation mit UsnRNPs demonstriert worden. YOR308c-p, YBR152w-p, YDL098c-p und YEL026w-p sind tri-snRNP Proteine, wie später z.T. durch Immunpräzipitation gezeigt wird (Kapitel 4.4.6). Diese Proteine werden daher ab im folgenden Snu66p, Spp381p, Snu23p und Snu13p genannt. YIR005w-p und Rse1p sind U2 snRNP-spezifische Proteine und werden in einem separaten Kapitel (4.7) behandelt. YIR005w-p erhielt den Namen Snu17p.

4.4.3 Sequenzanalyse der neu identifizierten, potentiellen tri-snRNP Proteine

Snu66p: YOR308c; 66,4 kDa; 587 Aminosäuren (Abb. 32). Eine Datenbanksuche zeigte, daß es ein menschliches Protein (SART-1) mit signifikanter Homologie gibt. Ein hoch konserviertes Sequenzmotiv, für das jedoch keine Funktion bekannt ist, findet sich am N-Terminus der beiden Proteine. Snu66p besitzt eine zweite Kopie dieses Motivs am N-Terminus. Dieses Motiv befindet sich auch noch in mindestens zwei weiteren unbekannten Proteinen aus *P.falciparum* und *C.elegans* (Acc.# AL019169 und U97005). Die Sequenz von Snu66p wurde mit bekannten, z.T. noch unveröffentlichten menschlichen snRNP-Proteinen verglichen. Snu66p weist eine signifikante Homologie mit dem humanen tri-snRNP Protein von 110 kDa auf (siehe auch Tab. 2), welches wiederum identisch mit SART-1 ist.

Snu66p	MNKTENLSIETNEI	15
U5-110	MGSSKKHRGEKEAAGTTAAAGTGGAQQPPRHREHKHKHRSRGGSGSGGERRKRSRERGGERSGRGAEAEARSSTHG	80
Snu66p	REKLGMP--VFOEKNTHKE-----SLSTETNELLASLGLK-----LIPPQONFNSSE--PNVHTSK	73
U5-110	RETSQABESERRVKERDDGYEAAASSTSSGDASLSLSTETNKLRAKLGLKPLEVNATKKEAGTKEEVTADVINPMA	160
Snu66p	I--DELREKITKFQKK--ANAPIRMAHLIETN--VNDSSWLENMDAIP--SSHESKRSSTPRK-----	131
U5-110	LQREELREKLAAAKEKRLNQLGKIKTLDGDDPWLDDTAAWIERSQLQKEKDIAEKRAKLLEEMDQFEGVSTLVEEE	240
Snu66p	GATKED--ENIDTHNVQVSYNTEALSPKDTLTLTKESSIF---DDT-----DSTEVLNVKAAEENADREKLRLRQ	198
U5-110	FGORRODLYSARDLQGLTVEHAIDSFREGETMLTLTKDKGVLEEDVLNVNVLVDKERAENVELRKKKPDYLPYAEDE	320
Snu66p	MNKDRRKKKILNVSSLIEEEEGEEK-HSITTH--LIIG-APQGVMKAPNTISAKPPTGKVKVNFDSANNMSDEGGD	274
U5-110	SVDLLAQOKPRSLISKYD--EELEGERPHSFRLEQGGTADGLRERELEIRAKLRLQAQSLSTVGPRLLASEYLTPEEMVT	398
Snu66p	FKPLKIKKRI--KDPRTKARKSKIT---DKME----IVKLVEDEDSLSWMEEE-QPVTIINP---RTS---SNNELK	337
U5-110	FKTKRRVKKIRKKEKEVVVRADLLPLGDDQTDGDFGSRILRGRGRRRVSEVEEEKPEVPQPLSDDTVENMDSIDSE	478
Snu66p	G--E-----EDLARETEKARDEEK-RRTESILKMRISNS-IVVDEKVTFTNTLDTLSLERSATENK---VKVHGE	401
U5-110	GGAPPPGSPQVLEDEDELELQKLEKGRRLRLQLQQLQQLRDSGEKVVEIVKKLESRQRGWEEDEDPERKGAIVFNATSE	558
Snu66p	GEKNIGDVINGHTEKESGNNTLTFAVNNEPNYEGDAENAPNFFSCLA---STLGYLRKK-----SVFTIGDVLKE---	469
U5-110	FCRTLGEIP---TYGLAGNREEQELMDFERDEERSANGGESDGEENIGWSTVNLDEEKQQQDFSSASTITLDEEIVN	635
Snu66p	EKDVN---NS---ES-LRRDVRNKEHTG---TGTY-TKDKLHGLEQFTSSDSSNANTHSKRQ-DHYDPEIKLVYRDE	534
U5-110	RLAAALLLCONKGLLETTVQKVARVKAPNKSLSAVYCIEDKMAIDDKYSRREEYRGFQDFKEKDGKPDVKLEYVDE	715
Snu66p	KENRLTQKEAYKKLSQKFGHTKSNKKK--R-----AKMKSR-----IEARKN--TP---ENGSLFEFD	586
U5-110	TKRKLTPKEAFROLSHREHGKSGKMKTERRMKKLDDEALLKMKSSSDTPLGTVALLOEKQKAQKTPYIVLSGSGKSMNA	795
Snu66p	N	587
U5-110	NTITK	800

Abb. 32: Sequenzvergleich von Snu66p und seinem humanen Orthologen, U5-110kD (SART-1)

Snu66p und das humane U5-110kD Protein (identisch mit SART-1) weisen 21 % Identität und 29 % Ähnlichkeit auf. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau unterlegt. Am N-Terminus haben beide Proteine ein hoch-konserviertes Sequenzmotiv, von dem Snu66p eine zweite Kopie besitzt (eingerahmt). Die Sequenzen der massenspektrometrisch identifizierten Peptide in Snu66p sind fett gedruckt und unterstrichen.

Spp381p: YBR152w; 33,8 kDa; 291 Aminosäuren (Abb. 33). Dieses Protein enthält keine Sequenzmotive, die eine bestimmte Funktion vermuten lassen, außer einer möglichen PEST-Proteolysedomäne [176]. Während die vorliegende Arbeit entstand, wurde dieses Protein von Lybarger und Mitarbeitern [177] in einem genetischen Screen als Suppressor einer Temperatur-sensitiven Mutation in dem tri-snRNP-assoziierten Spleißfaktor Prp38p entdeckt.

MSFRHFKRRL	DTSSADESSS	ADEEHPDQNV	SLTEK	<u>SASLS</u>	<u>HSDLGGEILN</u>	<u>GTGKN</u>	RTPND	GOESNESDGS	70	
PESEDESEPE	ESSDNDSSD	SDDMR	PLPRP	LFMKKKANNL	QKATK	<u>IDQPW</u>	<u>NAQDDAR</u>	VLQ	TKKENMIKNI	140
DKANQVAKNY	ETMKLR	<u>LNTN</u>	<u>YSTNEELIK</u>	Q	CLLLDDNDEV	DSEKERQKW	ERQNERKQKH	RRIQLAKQRE	210	
SEYEAKRFE	AMQKGKGNT	KYDVILDKEK	EKLDHKKQRS	AEKVEKSHNN	NRYKITRT	<u>KN</u>	<u>VEFGDLGKNS</u>		280	
RDYEETEYSV	I								291	

Abb. 33: Sequenz von Spp381p

Die Sequenzen der massenspektrometrisch identifizierten Peptide sind fett und unterstrichen. Eine vermutetes PEST-Proteolyse Signal ist eingerahmt (vgl. [177]).

Snu23p: YDL098c; 22,7 kDa; 194 Aminosäuren (Abb. 34): Dieses Protein enthält eine Zink-Finger-ähnliche Sequenz vom C_2H_2 -Typ (Positionen 82 bis 101). Zink-Finger Proteine besitzen die Fähigkeit an Nukleinsäuren zu binden, jedoch können sie auch mit Proteinen wechselwirken. Es sind bereits mehrere Spleißfaktoren bekannt, die Zink-Finger Motive enthalten, so z.B. Prp9p, Prp11p, U1-C, Prp6p. Snu23p könnte also mit der Zink-Finger Domäne an eine der snRNAs, die prä-mRNA oder ein anderes snRNP-Protein binden. In Sequenzdatenbanken lassen sich zahlreiche EST-abgeleitete Proteinsequenzen aus Mensch, Maus, Ratte, Drosophila, sowie ein *C.elegans* Protein identifizieren, die signifikante Homologie zu Snu23p aufweisen.

Snu23p	MSNFGRRITWDREYAEQARSGYDDRSLKATLTPIELQALKSKYTNYDHLIKGSLKDLNKRKLTANTESLSSFKRCKKFCF	80
H. sap.	RRKWKDEYEKLAERKLTREERKDKGKPVQ-RVERELERHRDYKVDLESK-LG--KTVVITKTPQSEMG---GY	68
	* * * *	
Snu23p	YCDICNLTFKDTLQYIDHLNKHVHAIKFEN-LFDEPLIIDIRDNDVDPQEEFELCYHNLKDFV-EVRSMETQSKRK--R	156
H. sap.	FCNVDCVVKDSINFLDHINGKKHQRNLGMSMRVERSTLD-QVKKRFEVNKKKMEEK--QKDYDXEERMKELREEEEEKAK	145
	* * * *	
Snu23p	LLDTDVBKAKKVATKP--SIESESKVSQMMGFSNFATSKK	194
H. sap.	AYKKEKQKEKKRRAEEDLTFEEDDEMAAVMGFSGFSGPKK	185

Abb. 34: Sequenzvergleich von YDL098cp mit einem möglichen menschlichen Homologen (EST)

Die Sequenz von YDL098cp wurde mit der Sequenz eines EST-abgeleiteten Humanproteins verglichen (Kombination der ESTs AI355051 und AA071273). Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau unterlegt. Die Sequenzen zeigen 22 % Identität und 36 % Homologie. Eine vermutete Zinkfinger-Domäne vom C_2H_2 -Typ ist umrahmt, die potentiell das Zink-Ion koordinierenden Aminosäuren sind mit einem Stern markiert.

Dib1p: YPR082c; 16,8 kDa; 143 Aminosäuren (Abb. 35). Dieses Protein ist evolutionär hochkonserviert und hat Homologe in *S. pombe*, Vertebraten, Pflanzen und Plasmodien. Alle diese Proteine zeigen hohe Sequenzhomologie zur Gruppe der Thioredoxine. Die genauere Sequenzanalyse zeigte, daß Dib1p das Orthologe des humanen U5 snRNP-assoziierten 15 kDa Proteins ist (siehe Tab. 2).

Dib1p	<u>MASVLLPQRTGWEVDQATVETKRLVVIRFGRKNDRCMMDELSSIAERVRNFAVIYLCIDIDEVSDFDEMYELTDPM</u>	80
U5-15kD	<u>MSYMLPHHNGWQVDOAILSEEDRVVIRFGHDWDPTCMKMDVLYSIAEKVKNFVAVIYLDITEVPDENKMYELVDPC</u>	79
Thioredox.	<u>MVKQIESKTAFQEAIDDAAGDKLVVVDHSATWCGPKMINPFFHSLSEKYSN-VIFLEVDVDDCQDVAS--ECEVKC</u>	73
Dib1p	<u>TVMFFYHNKHHMCDPCTGNNNKLNFIVDDKQEMIDILETLRGARKNKGLVVSPLYDYNHKRVS</u>	143
U5-15kD	<u>TVMFFFRNKHIMLDLGTGNNNKLNWAMEDKQEMVDIILETVRGARKGRGLVVSPLYDYSTKYRY</u>	142
Thioredox.	<u>TPTEQFFKKGQKVGFEFSANK-----EKLEAT-TNELV</u>	105

Abb. 35: Sequenzvergleich von Dib1p/Snu16p, dem humanen U5-15kD Protein und humanem Thioredoxin

Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau unterlegt. Dib1p und U5-15kDa sind zu 64 % identisch, 76 % ähnlich. Beide Proteine weisen eine signifikante Ähnlichkeit mit Thioredoxin auf (ca. 29 %). Die Sequenzen der massenspektrometrisch identifizierten Peptide in Dib1p/Snu16p sind fett gedruckt und unterstrichen.

Das *S. pombe* Ortholog von Dib1p, Dim1p, wurde bereits eingehend untersucht [174, 178]. In diesen Arbeiten konnten gezeigt werden, daß Dim1p an der Zellzyklusregulation beteiligt ist. Eine Mutation in Dim1p führt zur Unterbrechung des Zellzyklus beim Eintritt in die Mitose. Dim1p und Dib1p sind essentielle Proteine und das Maus-Ortholog kann den letalen Phänotyp einer *dib1*-Gen-Deletion unterdrücken [174]. Aufgrund der funktionellen Äquivalenz der Säuger- und Hefe-Proteine und der hohen Sequenzhomologie ist es sehr wahrscheinlich, daß Dib1p das Orthologe des humanen U5-15kD Proteins ist. Ein genetisches Depletionsexperiment in *S. cerevisiae* zeigte, daß Dib1p nicht nur aufgrund einer möglichen Beteiligung an der Zellzykluskontrolle essentiell ist, sondern daß es außerdem auch essentiell am prä-mRNA Spleißen beteiligt ist (Zellen, die von Dib1p depletiert wurden, akkumulierten ungespleißte prä-mRNA; P. Fabrizio, persönliche Mitteilung). Dib1p erhielt den Namen Snu16p, um auf seine Beteiligung am Spleißprozeß und seine Assoziation mit dem tri-snRNP hinzuweisen (siehe auch Diskussion).

Snu13p: YEL026w; 13,6 kDa; 126 Aminosäuren (Abb. 36). Dieses Protein ist das evolutionär hochkonservierte Orthologe des humanen U4/U6-spezifischen 15.5kD Proteins ([72]; siehe auch Tab. 2) und wurde daher Snu13p genannt. Beide Proteine sind zu 81% homolog und besitzen eine zentrale Domäne, die sich in zahlreichen Proteinen verschiedener Spezies wiederfindet. Diese Proteine sind alle Teil von Ribonukleoproteinkomplexen, was nahelegt, daß diese Proteindomäne aus einem neuen RNA-bindenden Sequenzmotiv bestehen könnte.

Snu13p	<u>MSAP--NPKAFPLADAALTTQQILLDVVQQAANLRQLKKGANEATKTLNRGISEFTVMAADCEPIETILLHLPL</u>	68
15.5 kD	<u>MTEADVNPAYPLADAHLLTKLLDLVQQSCNYKQLRKGANEAATKTLNRGISEFTVMAADAEPLLEILLHLPL</u>	70
Snu13p	<u>LLCEDKNVPYVFVPSRVALGRACGVS RPVIAASITNDASAIKTOIYAVKDKITETLLI</u>	126
15.5 kD	<u>LLCEDKNVPYVFVRSKQALGRACGVS RPVIACSVITKEGSQLKQIQSTQQSIEIRLLV</u>	128

Abb. 36: Sequenzvergleich von Snu13p und dem humanen U4/U6-15.5kD Protein

Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau unterlegt. Snu13p und das humane 15.5kD Protein sind zu 69% identisch, 81 % ähnlich. Durch einen gepunkteten Pfeil über den Sequenzen ist das zentrale, neue RNA-Bindungsmotiv angedeutet, wie es sich aus dem Sequenzvergleich zahlreicher homologer Proteine ableiten läßt ([72] und [179]). Die Sequenzen der massenspektrometrisch identifizierten Peptide in Snu13p sind fett gedruckt und unterstrichen.

Das humane 15.5kD Protein wurde in unserem Labor intensiv charakterisiert [72]: Dieses Protein bindet spezifisch an die 5'-terminale Haarnadelstruktur der U4 snRNA und die zentrale RNA-bindende Domäne ist essentiell für diese Wechselwirkung. Da für das Hefeorthologe, Snu13p, nicht zuletzt aufgrund der hohen Sequenzhomologie eine gleiche Funktion zu erwarten ist, wurde es hier nicht weiter untersucht (siehe auch Diskussion).

4.4.4 Elektronenmikroskopische Analyse des [U4/U6.U5] tri-snRNPs der Hefe

Das gereinigte [U4/U6.U5] tri-snRNP aus den Fraktionen 14 und 15 des Glyzeringradienten wurde auch für elektronenmikroskopische Studien seiner Struktur verwendet. Die Partikel wurden präpariert, wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, und in Zusammenarbeit mit Dr. B. Kastner im Transmissions-Elektronenmikroskop analysiert (Abb. 37 A).

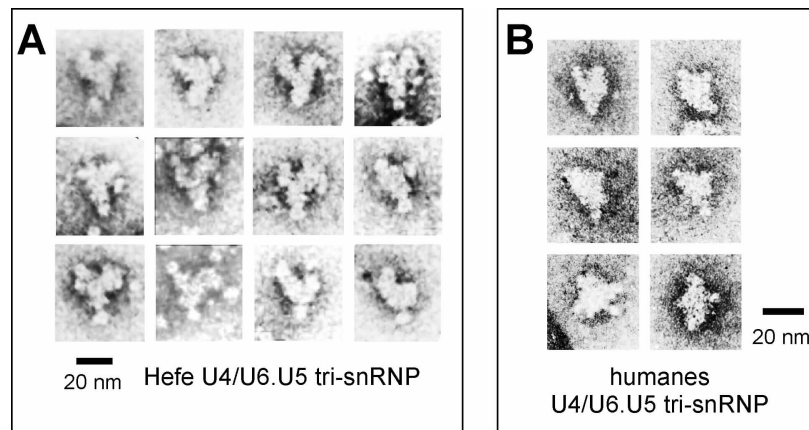


Abb. 37: Das [U4/U6.U5] tri-snRNP der Hefe hat eine Struktur, die der seines humanen Gegenstücks ähnelt.

A: Gereinigte [U4/U6.U5] tri-snRNPs aus den Fraktionen 14 und 15 des Glyzeringradienten in Abb. 29 wurden elektronenmikroskopisch untersucht. **B:** Zum Vergleich sind typische Ansichten des humanen [U4/U6.U5] tri-snRNPs gezeigt. Die Balken entsprechen 20 nm.

Die [U4/U6.U5] tri-snRNPs der Hefe haben eine Struktur, die recht komplex erscheint und, je nach der Orientierung, in der das Partikel auf dem Kohlenstoff-Film adsorbiert wurde, zu mehreren verschiedenen Ansichten führt. Die maximale Ausdehnung des tri-snRNPs beträgt ca. 30 x 40 nm. Grundsätzlich besteht das tri-snRNP-Partikel am "oberen" Ende (in der hier dargestellten Orientierung) aus zwei in etwa gleich großen Domänen von ca. 10 x 20 nm, die sich in der "Mitte" des Partikels vereinen und in einer dritten Domäne ähnlicher Außmaße nach "unten rechts" auslaufen. Je nach der Ansicht scheinen diese drei Domänen an ihren "äußeren" Enden aus kleineren, globulären Domänen zu bestehen, die möglicherweise einzelne Proteine darstellen könnten. Die [U4/U6.U5] tri-snRNPs der Hefe ähneln denen des Menschen (vgl. Abb. 37 B) viel stärker, als das bei den U1 snRNPs der Fall ist (siehe Abb. 14). Dies kommt sowohl in der Form, als auch der Größe dieser beiden Partikel zum Ausdruck. Allerdings wirkt die Struktur des menschlichen tri-snRNPs "kompakter". So sind die beiden oberen Domänen im Hefe-tri-snRNP deutlicher durch eine tiefe Furche getrennt, als dies im menschlichen Partikel der Fall ist. Dies könnte für die Anwesenheit zusätzlicher

Proteine an dieser Position im humanen tri-snRNP sprechen (z.B. das U5-100kD Protein, dessen Hefe-Ortholog, Prp28p, nicht im tri-snRNP enthalten ist). Wie in der Einleitung (Abb. 7) gezeigt wurde, konnte im menschlichen tri-snRNP durch Immun-Lokalisation bzw. durch Vergleich mit der Struktur des 20S U5 snRNPs ermittelt werden, daß in der "oberen linken" Domäne des Partikels das U4/U6 snRNP lokalisiert ist. Es wäre interessant, auch in der Hefe die Struktur des U5 snRNPs mit der des tri-snRNPs zu vergleichen, um abzuschätzen, ob das Hefe-tri-snRNP in seinen Domänen ähnlich strukturiert ist, wie das menschliche Partikel.

4.4.5 Fusionierung der potentiellen neuen snRNP-Proteine *in vivo* mit der IgG-bindenden Domäne des bakteriellen Protein A

Die potentiellen neuen [U4/U6.U5] tri-snRNP-Proteine waren in vereinigten Gradientenfractionen identifiziert worden, die außer den tri-snRNP- auch bekannte U2 und U1 snRNP-Proteine enthielten. Es war daher notwendig, die Assoziation von Snu66p, Spp381p und Snu23p mit snRNPs unabhängig durch Immunpräzipitation zu überprüfen. Auch Ynr5p, das zwei RBDs enthält, jedoch bei 200 mM Salz nicht mit den snRNPs kosedimentierte (Kapitel 4.4.2), sollte so untersucht werden. Aufgrund der guten Charakterisierung der humanen Orthologen von Dib1p/Snu16p und Snu13p wurde für diese Proteine auf diesen Nachweis verzichtet. Die U2 snRNP-Proteine Rse1p und Snu17p werden in 4.7 behandelt.

Anders als bei den U1 snRNP-spezifischen Proteinen wurde hier eine *in vivo*-Strategie zur Fusionierung von Proteinen mit einem Affinitäts-"Epitop" gewählt (anstelle der Antikörperproduktion). Hierbei werden die entsprechenden Gene so verändert, daß die Proteine konstitutiv mit einem Affinitätstag exprimiert werden, welches dann zur Immunpräzipitation der Proteine und damit assoziierter Protein-Komplexe genutzt werden kann. Dazu wird in einem haploiden Stamm ein DNA-Konstrukt, welches eine doppelte Kopie der IgG-Bindungsdomäne des Protein A aus *Staphylococcus aureus* enthält, direkt vor das Stopcodon des entsprechenden offenen Leserahmens integriert. Dieses Protein A Tag (protA) bindet spezifisch an IgG-Agarose und die entsprechend getaggten Proteine haben ein erwartetes Molekulargewicht von $x + 15$ kDa. Die Strategie zum 'Affinitätstaggging' wurde eingehend von Puig und Mitarbeitern [142] und im Methoden-Teil (3.2.5.1.8) beschrieben.

Für jedes der Proteine konnte so ein Hefestamm erzeugt werden, der eine C-terminal mit dem Protein A Tag fusionierte Version des entsprechenden Proteins exprimierte (AGY12: Snu66-protAp; AGY13: Spp381-protAp; AGY14: Snu23-protAp; AGY10: Ynr5-protAp). Alle Stämme wuchsen ohne erkennbaren Phänotyp mit der gleichen Rate wie Wildtypzellen, so daß von der Funktionalität der Fusionsproteine ausgegangen werden konnte.

4.4.6 Immunpräzitationsstudien mit den Protein A-fusionierten snRNP-Proteinen

Extrakte aus den Hefestämmen, welche die protA-fusionierten, potentiellen tri-snRNP-Proteine exprimierten, wurden für Immunpräzitationsstudien verwendet. Die IgG-Agarose-Präzipitate aus je 50 µl Extrakt wurden mit Pufferlösung (NET-2) verschiedener Salzkonzentrationen gewaschen, die snRNAs wurden aus den Präzipitaten extrahiert und nach denaturierender Gelelektrophorese auf einem 8% Acrylamid-/8M Harnstoff-Gel durch Northern Blot analysiert (Abb. 38). Als Negativkontrolle wurde ein Wildtyp-Extrakt aus dem parentalen Stamm (TR2 a) verwendet, der kein protA-fusioniertes Protein enthielt, um das Ausmaß unspezifischer Hintergrundbindung der snRNPs an die IgG Agarose abzuschätzen.

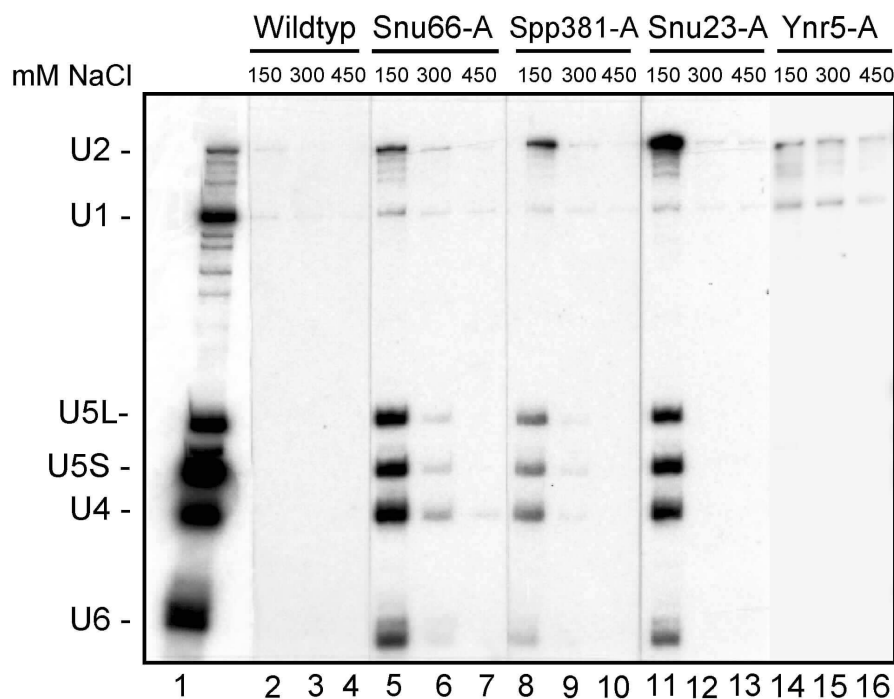


Abb. 38: [U4/U6.U5] tri-snRNPs und U2 snRNPs werden mit den protA-fusionierten Proteinen Snu66p, Spp381p und Snu23p, jedoch nicht mit Ynr5p koimmunpräzitiert

Je 150 µl von Extrakten aus Hefestämmen, die entweder kein protA-fusioniertes Protein (WT, Spuren 2-4) oder Snu66-protAp (Spuren 5-7), Spp381-protAp (8-10), Snu23-protAp (11-13) oder Ynr5-protAp (14-16) exprimieren, wurden mit je 60 µl IgG-Agarose in Puffer NET-2 150 (mit 150 mM NaCl) präzipitiert. Die Präzipitate wurden anschließend mit NET-2 Puffer mit 150, 300 oder 450 mM Salz gewaschen. Kopräzipitierte snRNAs wurden von der Agarose extrahiert, auf einem denaturierenden Harnstoff-Gel aufgetrennt und nach Northern Blot durch radioaktiv markierte DNA-Sonden (komplementär zu den U1, U2, U4, U5 und U6 snRNAs; je 20×10^6 cpm) identifiziert. Die Identität der snRNAs ist links indiziert. Die Salzkonzentrationen sind über den Spuren angegeben. In Spur 1 wurden zur Kontrolle isolierte Wildtyp-snRNAs aufgetragen, welche aus den vereinigten tri-snRNP-haltigen Gradientenfraktionen stammen.

Die drei Proteine Snu66p, Spp381p und Snu23p schienen unterschiedlich stabil mit dem tri-snRNP assoziiert zu sein. Mit allen drei Proteinen wurden bei 150 mM Salz die U4, U6 und U5 snRNAs kopräzipitiert (Abb. 38; Spuren 5, 8 und 11). Bereits bei 300 mM Salz ist die Assoziation von Snu66p (Spur 6) und, noch deutlicher, von Spp381p (Spur 9) mit dem tri-snRNP stark geschwächt, da nur noch sehr wenig U4, U6 und U5 snRNAs im Präzipitat

nachweisbar sind. Snu23p ist bei dieser Salzkonzentration vollständig von allen snRNPs abdissoziiert (Spur 12). Bei 450 mM Salz ist keines der Proteine mehr signifikant mit dem tri-snRNP assoziiert (Spuren 7, 10 und 13). Im Gegensatz dazu werden mit Ynr5-protAp auch bei 150 mM Salz keine signifikanten Mengen an snRNPs kopräzipitiert (Spuren 14-16). Dies ist ebenso der Fall beim Wildtyp-Extrakt, der kein protA-Fusionsprotein enthält (Spuren 2-4). Ynr5p wurde vermutlich unspezifisch mit den snRNPs im Ni-NTA Isolat koisoliert. Womöglich hat es aufgrund seiner RBDs eine schwache Affinität für snRNAs. Ynr5p wurde nicht weiter untersucht.

Interessanterweise wurde in diesem Experiment eine Kopräzipitation des U2 snRNPs mit den drei Proteinen Snu66p, Spp381p und Snu23p bei 150 mM Salz beobachtet (Spuren 5, 8 und 11). Da mit keinem dieser drei Proteine das U1 snRNP kopräzipitiert wurde und auch die Negativkontrolle in Spur 2 keine U1 snRNA enthielt, ist die Kopräzipitation von U2 und tri-snRNPs mit Snu66p, Spp381p und Snu23p spezifisch. Dabei ließ sich eine unterschiedlich starke Assoziation der Proteine mit dem U2 snRNP feststellen: Mit Snu23p wurde deutlich mehr U2 snRNP kopräzipitiert als mit den beiden anderen Proteinen. Snu66p, Spp381p und Snu23p sind offenbar sowohl mit dem [U4/U6.U5] tri-snRNP als auch mit dem U2 snRNP assoziiert. Dies warf die Frage auf, ob diese Proteine unabhängig mit beiden snRNPs assoziiert, oder ob sie eventuell Teil eines [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNPs sind.

4.4.6.1 Snu66p, Spp381p und Snu23p sind mit [U4/U6.U5] tri-snRNPs und [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNPs assoziiert

Um die Frage zu beantworten, ob Snu66p, Spp381p und Snu23p unabhängig mit tri-snRNPs und U2 snRNPs assoziiert sind, wurden die in Gesamtzellextrakten enthaltenen UsnRNPs zunächst durch Glyzeringradienten-Zentrifugation voneinander getrennt. Je 140 µl Extrakt, welche die protA-fusionierten Proteine Snu66-protAp, Spp381-protAp oder Snu23-protAp enthielten, wurden in einem 10-30% Glyzeringradienten mit 150 mM Salz bei 55.000 U/min für 3h in einer TL-100 Ultrazentrifuge (Beckman) sedimentiert. Unter diesen Bedingungen sedimentieren U2 snRNPs etwa in der Mitte, tri-snRNPs etwa im unteren Drittel des Gradienten. Noch größere Komplexe mit Sedimentationskoeffizienten bis ca. 40 S werden in diesem Gradientenbereich ebenfalls noch aufgelöst, ohne am Röhrchenboden zu sedimentieren. Die Gradienten wurden nach beendeter Zentrifugation in 160 µl-Portionen fraktioniert. 40 µl jeder Fraktion wurden durch Northern und Western Blot auf ihren Gesamtgehalt an snRNA bzw. an bestimmten snRNP-Proteinen untersucht. Die restlichen 120 µl jeder Fraktion wurden jeweils einzeln mit IgG-Agarose immunpräzipitiert. Der snRNA-Gehalt der Präzipitate wurde anschließend ebenfalls durch einen Northern Blot analysiert (Abb. 39).

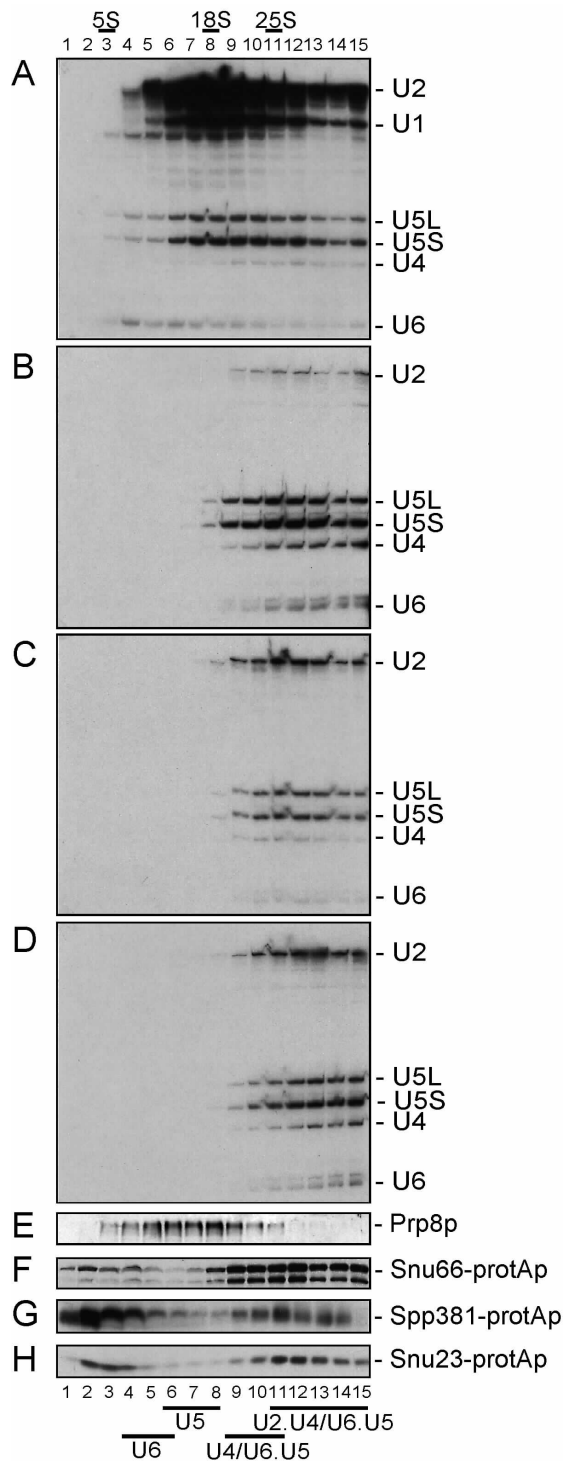


Abb. 39: [U4/U6.U5] tri-snRNPs und [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNPs werden mit Snu66-protAp, Spp381-protAp und Snu23-protAp aus Gradientenfraktioniertem Gesamtextrakt kopräzipitiert

Gesamtzellextrakte aus den Hefestämmen, welche die protA-fusionierten Proteine Snu66-protAp, Spp381-protAp oder Snu23-protAp exprimieren, wurden auf 10-30%igen Glyzeringradienten zentrifugiert. 15 Fraktionen wurden abgenommen und je 1/4 jeder Fraktion wurde auf snRNA-Gehalt mit Northern Blot (A; beispielhaft sind hier die snRNAs des Snu66-protAp Gradienten gezeigt) oder Protein-Gehalt mit Western Blot analysiert (E: Prp8p; F: Snu66-protAp; G: Spp381-protAp; H: Snu23-protAp). Die restlichen 3/4 jeder Fraktion wurden mit IgG Agarose präzipitiert, der snRNA-Gehalt der Präzipitate wurde wiederum durch einen Northern Blot analysiert (B: Snu66-protAp; C: Spp381-protAp; D: Snu23-protAp). Rechts ist die Identität der snRNAs bzw. Proteine indiziert.

Das Sedimentationsverhalten der snRNPs im Gradienten ist in Abb. 39 A gezeigt. U2 und U1 snRNPs sedimentieren mit einem Maximum bei 18 S (Fraktionen 7-10), sind aber signifikant auch noch in Fraktionen höherer S-Werte zu finden (Fraktionen 11-15; 25-35S). Freies U6 snRNP sedimentiert mit einem Maximum zwischen Fraktionen 4 und 7 (ca. 7-15S). U5 snRNPs sedimentieren als freie Partikel in den Fraktionen 6-9 (10-20S). In den Fraktionen 10-12 findet sich das 25S [U4/U6.U5] tri-snRNP, da dort auch U4 und U6 snRNPs mit dem U5 snRNP kosedimentieren. Geringere Mengen von U4, U5 und U6 snRNPs sind aber auch noch in den letzten Fraktionen (13-15; ca. 30-35S) zu detektieren.

Der snRNA-Gehalt der Immunpräzipitate aus den drei Gradienten, die Snu66-

protAp, Spp381-protAp oder Snu23-protAp enthielten, ist in Abb. 39 B-D gezeigt. Das [U4/U6.U5] tri-snRNP wird mit allen drei Proteinen aus den 25S-Fraktionen präzipitiert (Frakt. 10-13). Auch das U2 snRNP wird aus diesen Fraktionen mit allen drei Proteinen kopräzipitiert. U2 wird signifikanterweise jedoch auch aus den letzten Gradientenfraktionen (14 und 15), ebenfalls zusammen mit U5, U4 und U6 snRNPs kopräzipitiert. Diese Präzipitation ist spezifisch, da das U1 snRNP mit keinem der drei Proteine kopräzipitiert wird. Insbesondere bei Snu23p (Abb. 39 D) fällt auf, daß das Maximum der Präzipitation von U2,

U4, U5 und U6 snRNPs in den letzten Fraktionen (13-15) liegt, also in dem Bereich des Gradienten, in dem Partikel mit Sedimentationskoeffizienten von 30-35S fraktionieren. Das gleiche Verhalten weisen auch Snu66p und Spp381p auf, wenn auch nicht so deutlich ausgeprägt wie bei Snu23p. Dieser Befund deutet darauf hin, daß alle drei Proteine mit dem [U4/U6.U5] tri-snRNP, aber darüber hinaus auch mit einem ca. 35S großen [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNP assoziiert sein müssen. Besonders deutlich wird dies, wenn man die Sedimentation und Präzipitation des U2 snRNPs vergleicht: U2 wird mit allen drei Proteinen nur aus den Fraktionen 10-15 präzipitiert, jedoch nicht aus den dem 18S U2 Monopartikel entsprechenden Fraktionen 7-10.

Die Sedimentation von Snu66p, Spp381p und Snu23p im Gradienten wurde durch einen Western Blot aller Gradienten-Fraktionen vor der Präzipitation analysiert (Abb. 39 F-H). Der Großteil von Snu66p und Snu23p, sowie etwa die Hälfte von Spp381p, die sich im Extrakt befanden, sedimentierte zusammen mit den oben beschriebenen snRNPs in den Fraktionen 9-15. Keines der Proteine kosedimentierte mit den freien U2 oder U5 snRNPs in den Fraktionen 5-9, und der Rest der im Extrakt vorhandenen Proteine sedimentierte jeweils in freier Form am oberen Ende der Gradienten (Fraktionen 1-4). Zum Vergleich wurde auch die Sedimentation des U5 snRNP-spezifischen Proteins Prp8p überprüft (Abb. 39 E). Dieses Protein sedimentierte hauptsächlich mit dem freien U5 snRNP, in Fraktionen 3-11. Geringe Mengen konnten jedoch auch in den Fraktionen 12-15 detektiert werden (dies ist in Abb. 39 E nicht gut zu erkennen).

Insgesamt wird durch diese Resultate deutlich, daß die Mehrheit der löslichen Snu66p und Snu23p Proteine und ein signifikanter Anteil des Spp381p Proteins in Gesamtzell-extrakten mit [U4/U6.U5] tri-snRNPs und [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNPs assoziiert ist. Da die Proteine schon bei geringen Salzkonzentrationen von den snRNPs abdissoziierten, konnte nicht geklärt werden, ob sie einen primären Bindungspartner im tri- bzw. tetra-snRNP haben, oder ob sie z.B. in einem Interaktionsbereich zwischen dem tri-snRNP und dem U2 snRNP lokalisiert sind. Die Proteine könnten somit Affinität für beide snRNP-Komplexe haben und nach Dissoziation des tetra-snRNPs mal mit dem freien tri-snRNP, aber auch mit dem freien U2 snRNP assoziiert bleiben. Diese Frage sollte näher untersucht werden.

4.4.6.2 Snu66p und Spp381p assoziieren primär mit dem U5 snRNP, während Snu23p primär das U4 snRNP bindet

Um die Frage zu klären, mit welchem snRNP die drei Proteine primär assoziiert sind, wurden Immunpräzipitationsexperimente aus Extrakten durchgeführt, die von U2, U4 oder U6 snRNA depletiert waren. In einem Hefeextrakt können bestimmte RNAs durch Inkubation mit einem komplementären DNA-Oligonukleotid zerstört werden, da die Bildung einer RNA-DNA Duplex die Hydrolyse der RNA in dieser Duplex durch RNaseH induziert. RNaseH ist

im Hefeextrakt in ausreichender Menge enthalten. Oligonukleotide, die gegen die U2 oder die U6 snRNAs gerichtet sind, führen daher auch zur Unterbindung der *in vitro* Spleißaktivität [146, 147]. Die snRNAs werden zum Teil vollständig hydrolysiert (U6 snRNA), da der Spaltung durch RNaseH eine komplette Hydrolyse der nun ungeschützten RNA durch RNasen folgt [147]. Auch die Hydrolyse der U4 snRNA läßt sich so erreichen (P. Fabrizio, persönliche Mitteilung), während die U5 snRNA in ihrer gesamten Länge durch Proteine bedeckt zu sein scheint, so daß kein Oligonukleotid binden kann.

Extrakte, die Snu66-protAp, Spp381-protAp, Snu23-protAp oder kein protA-fusioniertes Protein enthielten (Wildtyp), wurden mit Oligonukleotiden inkubiert, die zur spezifischen Depletion der U2, U4 und U6 snRNAs führten. Zur Kontrolle wurden die Extrakte entweder einzeln, mit allen Oligos gleichzeitig oder ohne jedes Oligo inkubiert. Anschließend wurden jeweils Immunpräzipitationen mit IgG-Agarose durchgeführt und die kopräzipitierten snRNAs wurden durch Northern Blot analysiert (Abb. 40).

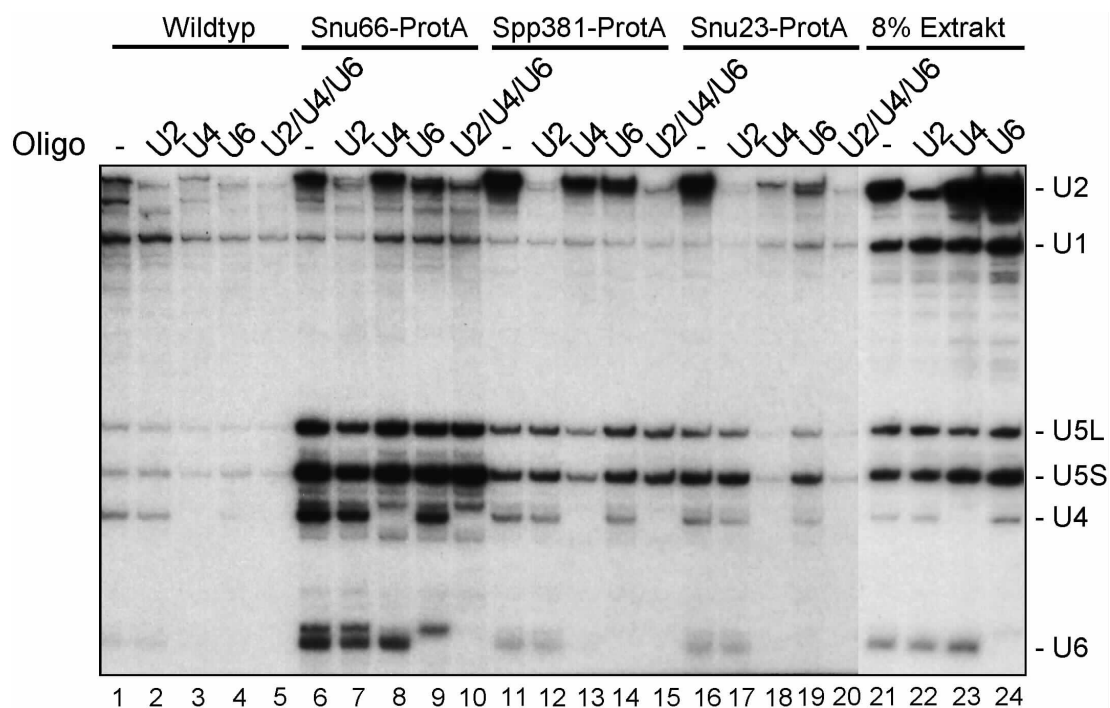


Abb. 40: Koimmunpräzipitation von snRNPs mit Snu66p, Spp381p und Snu23p aus Δ U2-, Δ U4- und Δ U6- Zellextrakten

Spleißextrakte wurden unter Spleißbedingungen (allerdings mit nur 0,8 mM ATP) bei 30°C für 30 min mit verschiedenen DNA-Oligonukleotiden inkubiert, was zur spezifischen Hydrolyse der U2, U4 oder U6 snRNA durch RNaseH führt. Es wurden Wildtyp- (Spuren 1-5), Snu66-protAp- (6-10), Spp381-protAp- (11-15) und Snu23-protAp- (16-20) Extrakte verwendet. Die Extrakte (je 50 μ l) wurden entweder ohne Oligonukleotid (Spuren 1, 6, 11 und 16), 188 pmol Oligo U2_{kill} (Spuren 2, 7, 12, 17), einer Mischung aus zwei Oligos, die an U4 snRNA binden (je 46,9 pmol Oligo U4_{kill} I und Oligo U4_{kill} II; Spuren 3, 8, 13, 18), 188 pmol Oligo U6_{kill} (Spuren 4, 9, 14, 19) oder einer Mischung aus allen vier Oligos (gleiche Mengen; Spuren 5, 10, 15, 20) inkubiert. Anschließend wurden die depletierten Extrakte mit IgG-Agarose präzipitiert. Die Präzipitate wurden mit NET-2 Puffer (100 mM NaCl) gewaschen, snRNAs wurden aus den Präzipitaten extrahiert und durch Northern Blot analysiert. Die snRNAs von je 8% der Menge an verdautem Wildtyp-Extrakt, die für die Immunpräzipitation verwendet wurde, sind in den Spuren 21 bis 24 aufgetragen (21: kein Oligo; 22: Oligo gegen U2; 23: Oligos gegen U4; 24: Oligo gegen U6). Die obere der zwei Banden im U6 snRNA-Bereich ist ein U4 snRNA-Abbauprodukt (vgl. z.B. Spuren 6 und 8).

Die Selektivität und Vollständigkeit des RNaseH-Verdaus wurde überprüft, indem die snRNAs aus jeweils 8% der Ausgangsmenge des jeweils mit Oligonukleotiden behandelten Wildtyp-Extraktes analysiert wurden (Abb. 40; Spuren 21-24). Die Inkubation des Extraktes mit dem U2 snRNA-spezifischen Oligo führt nicht zur vollständigen Hydrolyse der U2 snRNA. Vielmehr wird nur ein Stück der RNA am 5'-Ende verdaut, welches im Spleißosom die Branchpoint-Region der prä-mRNA bindet, eine verkürzte U2 snRNA bleibt im Extrakt zurück, deren Menge im Vergleich zum nicht-verdauten Extrakt jedoch stark reduziert ist (vergleiche Spur 21 und 22). Die U4 (Spur 23) sowie die U6 snRNAs (Spur 24) werden weitgehend zerstört; ein kurzes Stück der U4 snRNA bleibt vermutlich durch die Bindung von Proteinen (evtl. Snu13p) vor Hydrolyse geschützt (nicht gezeigt).

Aus dem Wildtyp-Extrakt wurden jeweils nur Hintergrundmengen an snRNPs präzipitiert (Abb. 40, Spuren 1-5). Mit Snu66-protAp, Spp381-protAp und Snu23-protAp wurden jeweils U2 und tri-snRNPs bzw. [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNPs, jedoch nur Hintergrundmengen an U1 snRNPs präzipitiert (Spuren 6, 11 und 16). In keinem Fall hatte die Hydrolyse der U2 snRNA einen Einfluß auf die Assoziation des entsprechenden Proteins mit dem tri-snRNP (Spuren 7, 12, 17). Es ist daher anzunehmen, daß Snu66p, Spp381p und Snu23p auch in Abwesenheit von U2 snRNP stabil an das tri-snRNP binden können, im Einklang mit dem Resultat der Immunpräzipitation aus dem Glyzeringradienten (Abb. 39) und den Resultaten von Lybarger und Mitarbeitern [177], die Spp381p als tri-snRNP-assoziiertes Protein nachweisen konnten.

Wird die U4 snRNA partiell hydrolysiert, so werden mit Snu66p immer noch U2, U5 und U6 snRNPs kopräzipitiert. Die Hydrolyse der U4 snRNA hat also scheinbar keinen Einfluß auf die Bildung des tetra-snRNPs. Die Protein/Protein-Wechselwirkungen, die auf Seiten des U4 snRNPs für die Formierung des tetra-snRNPs nötig sind, scheinen nicht von der U4 snRNA abhängig zu sein. Wird die U6 snRNA hydrolysiert, so verbleibt Snu66p mit U2, U5 und U4 snRNPs assoziiert, werden alle drei snRNAs (U2, U4 und U6) gleichzeitig hydrolysiert, so bindet Snu66p immer noch stabil an das U5 snRNP. Somit ist U5 snRNP der primäre Bindungspartner von Snu66p im tri- und tetra-snRNP.

Spp381p verhält sich etwas anders. Wird die U4 snRNA hydrolysiert, so werden nur noch U2 und U5 snRNPs mit Spp381p präzipitiert, jedoch nicht die U6 snRNA. Fehlt dagegen die U6 snRNA, so werden mit dem Protein immer noch die U2, U5 und U4 snRNAs kopräzipitiert. Werden U2, U4 und U6 gleichzeitig hydrolysiert, so verbleibt auch Spp381p stabil am U5 snRNP gebunden; auch hier scheint das U5 snRNP der primäre Bindungspartner zu sein. Anders als bei Snu66p scheint aber hier die intakte U4 snRNA für eine stabile Integration des U6 snRNPs im tetra-snRNP nötig zu sein. Spp381p geht vermutlich keine direkte Wechselwirkung mit dem U6 snRNP ein, dagegen könnte Snu66p zusätzlich eine Affinität für das U6 snRNP haben.

Snu23p zeigt wiederum ein anderes Verhalten. Sobald die intakte U4 snRNA depletiert ist, verliert das Protein den Kontakt zu allen vier snRNPs. Die Hydrolyse der U6 snRNA führt zu einer Verringerung der Kopräzipitation von U2 snRNA, die Assoziation von Snu23p mit den U5 und U4 snRNPs wird jedoch nicht beeinflusst. Snu23p bindet demnach vermutlich primär an das U4 snRNP, könnte aber zum Zusammenhalt des gesamten tetra-snRNPs beitragen.

Dieses Experiment verdeutlicht, daß die drei Proteine Snu66p, Spp381p und Snu23p in erster Linie tri-snRNP-Proteine sind. Bei keinem der drei Proteine führt die Deletion der U2 snRNA zu einer Reduktion der Bindung dieser Proteine an das tri-snRNP, sie sind also nicht spezifisch nur mit dem [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNP, sondern mit tri- und tetra-snRNPs assoziiert. Daß die Zerstörung der U4 snRNA die Assoziation von Snu23p mit dem U2 snRNP unterbindet, ist darüberhinaus ein indirekter Beweis für die Existenz des tetra-snRNPs.

4.4.7 Funktionen von Snu66p, Spp381p und Snu23p im prä-mRNA Spleißen *in vitro*

Die neuen Proteine Snu66p, Spp381p und Snu23p sind mit dem [U4/U6.U5] tri-snRNP und einem bisher nur ungenau charakterisierten [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNP assoziiert (Kapitel 4.4.6 und 4.4.6.1). Es liegt daher nahe, daß diese Proteine auch direkt am Spleißprozeß beteiligt sind. Um mögliche Funktionen dieser Proteine zu ermitteln, wurde zunächst eine *in vitro* Strategie gewählt. Jedes dieser Proteine ließ sich *in vivo* als ProtA-Fusionsprotein exprimieren (siehe Kapitel 4.4.6). Die Spleißreaktion könnte sich möglicherweise in den entsprechenden Extrakten *in vitro* durch Inkubation mit unspezifischen IgG-Antikörpern inhibieren lassen. Der Protein A-Teil der Fusionsproteine bindet diese IgGs und somit würde eine sterisch hinderliche Proteinmasse (ca. 160 kDa) zusätzlich in das (assemblierende) Spleißosom hineingetragen, wenn diese Proteine fest assoziierte Bestandteile des Spleißosoms sind. Auch wenn die entsprechenden Proteine nur an der Assemblierung beteiligt, jedoch nicht Bestandteil des aktiven Spleißosoms wären, könnte man einen inhibitorischen Effekt der Antikörper erwarten.

Spleißreaktionen wurden *in vitro* mit den Extrakten durchgeführt, welche die protA-fusionierten Proteine Snu66p, Spp381p oder Snu23p enthielten. Dabei wurden steigende Mengen an unspezifischen Kaninchen-IgGs (über Protein A Sepharose aus Serum gereinigt) in die Reaktionansätze titriert. Zur Kontrolle diente ein Wildtyp-Extrakt, der kein protA-Fusionsprotein enthielt. Nach 15 min Prä-Inkubation bei 23°C wurde radioaktiv markierte prä-mRNA als Substrat zu den Reaktionsansätzen gegeben. Nach 25 min Reaktionszeit wurden die Reaktionen durch Zugabe von SDS und Proteinase K gestoppt und die radioaktiv markierten RNAs wurden analysiert (Abb. 41).

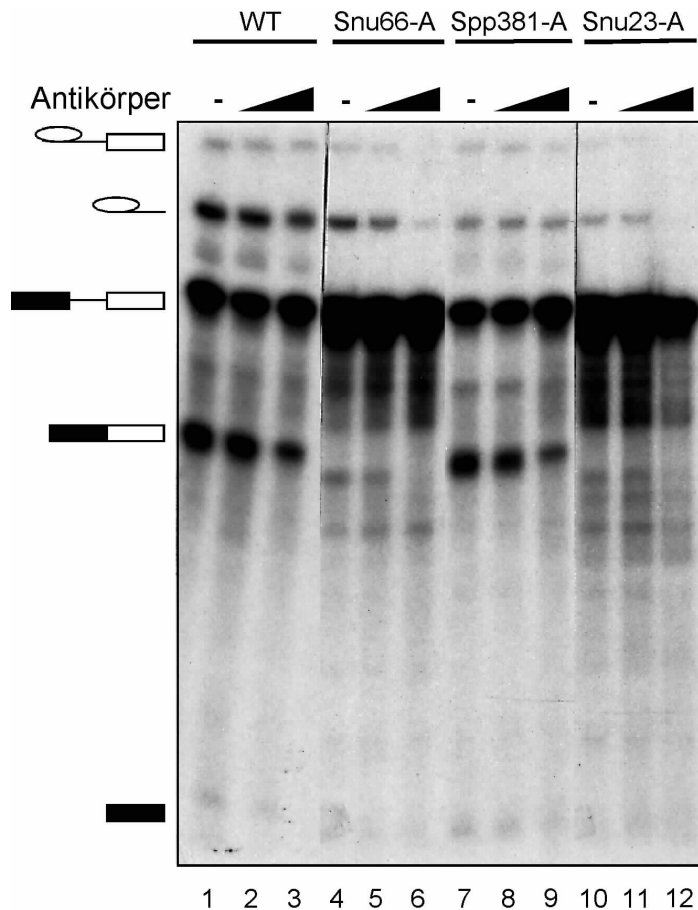


Abb. 41: Unspezifische Antikörper inhibieren Spleißen *in vitro* in einem Extrakt, der protA-fusioniertes Snu66p enthält

Spleißreaktionen wurden *in vitro* mit Wildtyp-Extrakt (Spuren 1-3) bzw. Extrakten, welche die protA-fusionierten Proteine Snu66p (Spuren 4-6), Spp381p (7-9) oder Snu23p (10-12) enthielten, angesetzt. Die Reaktionsansätze wurden mit steigenden Mengen an unspezifischen, affinitätsgereinigten Kaninchen-IgGs präinkubiert. Es wurden entweder keine Antikörper (Spuren 1, 4, 7, 10), 1,625 μ M IgGs (Spuren 2, 5, 8, 11) oder 6,25 μ M IgGs zu den Reaktionsansätzen gegeben (Spuren 3, 6, 9, 12). Pro Reaktion wurden 10.000 cpm radioaktiv markierte Aktin prä-mRNA (ca. 1,5-2 fmol) eingesetzt. Die Spleißprodukte wurden anschließend durch denaturierende Harnstoff-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Identität der radioaktiven RNA-Spezies ist links angegeben; von oben nach unten: Intron-Lariat-Exon2-Intermediat, herausgeschnittenes Intron-Lariat, prä-mRNA, gespleißte mRNA, gespleißtes Exon1-Intermediat.

Im Wildtyp-Extrakt ist kein Einfluß der IgGs auf die Spleißreaktion feststellbar (Spuren 1-3), da im wesentlichen immer die gleiche Menge an mRNA, herausgeschnittenem Intron-Lariat und Spleißintermediaten (gespleißtes Exon1 und Intron-Lariat-Exon2) gebildet wird. Im Snu66-protAp Extrakt jedoch ist mit steigender Menge an zugegebenen IgGs eine deutliche Inhibition der Spleißreaktion feststellbar (Spuren 4-6). Diese Inhibition muß sich vor dem ersten katalytischen Schritt ereignen, da sowohl die Bildung der Produkte als auch der Zwischenstufen der Reaktion inhibiert wird. Beim Spp381-protAp Extrakt ist kein signifikanter Einfluß der IgGs auf die Spleißreaktion festzustellen (Spuren 7-9), beim Snu23-protAp Extrakt ist zwar ein geringer inhibitorischer Effekt der IgGs festzustellen, jedoch ist die Spleißaktivität des Extraktes zu gering, als daß sich eine signifikante Aussage machen ließe.

Es sollte nun gezeigt werden, daß der inhibitorische Effekt von IgGs im Extrakt, der das ProtA-fusionierte Snu66p enthielt, tatsächlich auf die Bindung der IgGs nur an Snu66-protAp zurückzuführen ist. Daher wurde untersucht, ob sich die Spleißinhibition durch Zugabe von rekombinantem Snu66p wieder aufheben läßt. Rekombinantes Snu66p wurde als GST-Fusionsprotein in *E.coli* überexprimiert und gereinigt (vergl. dazu Kapitel 4.3.5.1). Der Snu66-protAp-haltige Spleißextrakt wurde mit IgGs in einer Konzentration inkubiert, die zur nahezu vollständigen Inhibition der Spleißreaktion führt (vergl. Abb. 41). Zu diesen Extrakten

wurde zusätzlich GST-Snu66p in steigenden Mengen zugegeben und die gesamte Mischung wurde unter Spleißbedingungen prä-inkubiert, bevor das radioaktiv markierte Substrat zugegeben wurde. Nach 25 min Inkubation wurden die Spleißreaktionen gestoppt und die radioaktiv markierten RNAs (Substrat und Produkte) wurden analysiert (Abb. 42).

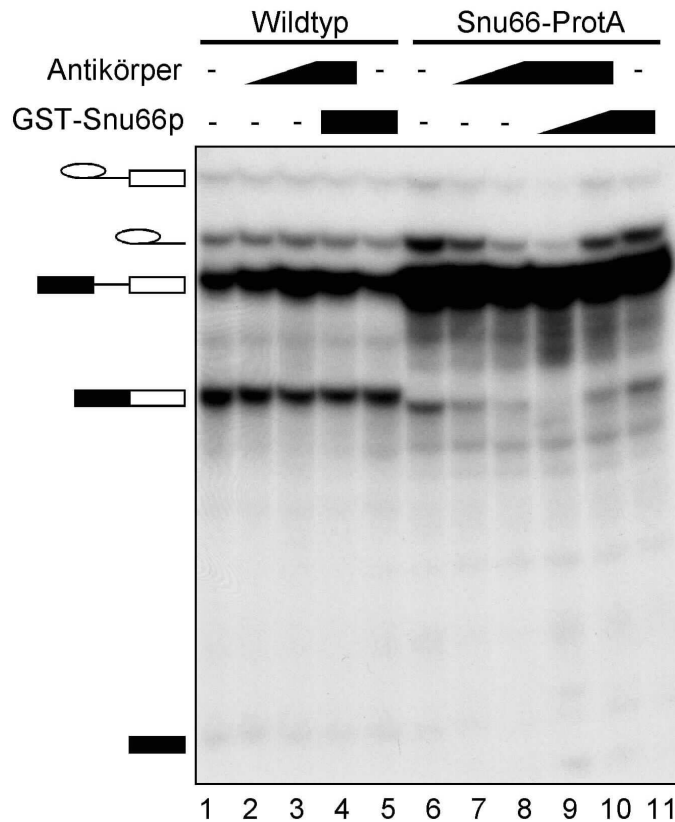


Abb. 42: Rekombinantes GST-Snu66p rekonstituiert die Spleißaktivität im durch IgGs inhibierten Snu66-protAp-haltigen Extrakt

Spleißreaktionsmischungen mit Wildtyp- (Spuren 1-5) oder Snu66-protAp-haltigen Extrakten (Spuren 6-11) wurden *in vitro* mit verschiedenen Mengen unspezifischer IgG-Antikörper inkubiert: Spuren 1, 5, 6, 11 - keine IgGs; Spuren 2 und 7 - 1,625 μ M IgGs; Spuren 3, 4, 8, 9, 10 - 6,5 μ M IgGs. Zusätzlich wurde auch rekombinantes GST-Snu66p zugegeben: Spur 9 - 0,16 μ M; Spuren 4, 5, 10, 11 - 0,48 μ M. Nach einer Prä-Inkubation wurde radioaktiv markierte Aktin prä-mRNA als Substrat zu den Reaktionsmischungen zugegeben und die Reaktionen wurden für 25 min inkubiert. Die Analyse von radioaktiv markiertem Spleißsubstrat und -produkten erfolgte wie in Abb. 41 beschrieben.

Der Snu66-protAp-haltige Extrakt wurde, wie zuvor, durch die Zugabe von IgGs in seiner Spleißaktivität fast vollständig inhibiert (Abb. 42; Spuren 7 und 8). Die zusätzliche Inkubation mit dem rekombinanten GST-Snu66p führte jedoch zu einer effizienten Rekonstitution der Spleißaktivität (Spuren 9 und 10; vgl. mit der beobachteten Spleißaktivität im Wildtyp-Extrakt in Spuren 1-3, bzw. dem Snu66-protAp Extrakt ohne Zugabe von IgGs in Spur 6). Die Antikörper hatten keinen inhibitorischen Einfluß auf die Spleißaktivität des Wildtyp-Extraktes (Spuren 2-3). Außerdem hatte die Inkubation beider Extrakte mit GST-Snu66p alleine keinen Einfluß auf die Spleißaktivität (Spuren 5 und 11). Damit ist bewiesen, daß die Inhibition der Spleißreaktion durch IgGs im Snu66-protAp-haltigen Extrakt einzig durch die Bindung dieser IgGs an das Snu66p Protein und nicht durch sekundäre Effekte herrührt. Snu66p könnte durch die Bindung der Antikörper direkt in seiner spleißosomalen Funktion beeinträchtigt werden. Es läßt sich aber auch nicht ausschließen, daß die Antikörper in räumlicher Nähe zu Snu66p zu einer sterischen Beeinträchtigung der Spleißosombildung oder der Spleißreaktion führen könnten, ohne daß Snu66p direkt an diesen kritischen Interaktionen beteiligt ist.

4.4.8 Spp381p und Snu23p sind am Spleißen *in vivo* beteiligt

Die Spleißaktivität der Spp381-protAp- und Snu23-protAp-haltigen Extrakte ließ sich *in vitro* nicht (Spp381p) oder nicht eindeutig (Snu23p) inhibieren. Dies muß nicht bedeuten, daß diese Proteine nicht essentiell für die Spleißreaktion sind. Es wäre möglich, daß die benutzten Konzentrationen an IgGs nicht ausreichten, um einen Effekt zu erzielen oder die Proteine könnten so zentral im Spleißosom positioniert sein, daß sie für die Antikörper unzugänglich sind. Daher wurde eine *in vivo* Strategie gewählt, um eine Beteiligung dieser beiden Proteine am Spleißprozess zu überprüfen.

Durch homologe Rekombination wurde der induzierbare *GALI* Promotor zwischen die natürlichen Promotoren von *SPP381* und *SNU23* und die entsprechenden kodierenden Regionen dieser Gene integriert. Dadurch wurde erreicht, daß *SPP381* und *SNU23* nur in Gegenwart von Galaktose im Kulturmedium exprimiert werden (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.5.1.7). Die erzeugten Hefestämme (AGY22 und AGY23) wurden über Nacht in Galaktose-haltigem Medium kultiviert. Dann wurde die Hälfte der Zellen in Glukose-haltiges Medium versetzt (durch Glukose wird der *GALI* Promotor reprimiert). Die Kulturen wurden immer so verdünnt, daß die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase

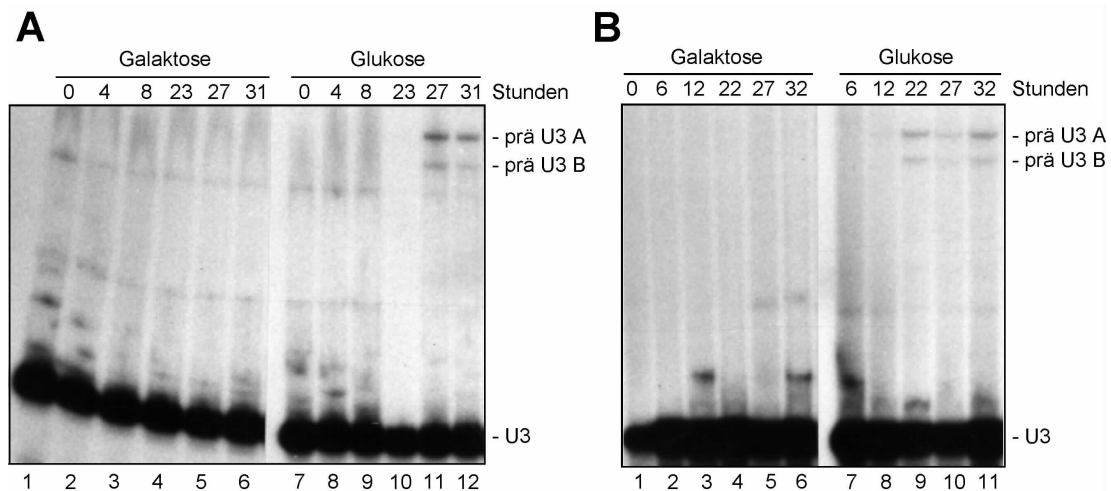


Abb. 43: Spp381p und Snu23p werden für effizientes Spleißen *in vivo* benötigt

Primer-Extensions-Analyse von (prä-) U3 RNA, die aus Zellen extrahiert wurde, welche konditional *SPP381* (Stamm AGY22; **A**) oder *SNU23* (Stamm AGY23; **B**) unter der Kontrolle des Galaktose-induzierbaren *GALI* Promotors exprimieren. Beide Hefestämme wurden parallel in Galaktose- und Glukose-haltigem Wachstumsmedium kultiviert und jeweils so verdünnt, daß die Zellen im exponentiellen Wachstum blieben. Zu definierten Zeitpunkten wurden den Kulturen Zellen entnommen und aus diesen wurde Gesamt-RNA extrahiert. Diese wurde als Templat für Reverse Transkriptase mit einem zum 3' -Exon der U3 RNA komplementären, radioaktiv markierten DNA-Primer benutzt. Die radioaktiv markierten Extensionsprodukte wurden anschließend extrahiert und nach denaturierender Harnstoff-PAGE durch Autoradiographie analysiert. Links (Spuren 1-6): Wachstum in Galaktose-haltigem Nährmedium (Expression), rechts (Spuren 7-12, bzw. 11): Wachstum in Glukose (Repression). Über den Spuren sind jeweils die Wachstumszeiten der extrahierten Zellen bezüglich des Beginns der Inkubation in Glukose angegeben. Rechts sind die Identitäten der Transkripte angegeben: Prä-U3 A und prä-U3 B (es existieren zwei Gene mit unterschiedlich langen Introns), sowie gespleißte U3 RNA.

mit maximaler Proteinsynthese blieben (OD_{600} 0,2-0,5). Zu definierten Zeitpunkten wurden Zellen aus den parallel wachsenden Kulturen (Galaktose bzw. Glukose) entnommen und Gesamt-RNA extrahiert. Anhand der isolierten RNAs wurde die *in vivo* Spleißaktivität der Zellen untersucht. Dazu diente eine Primer-Extension mit Reverser Transkriptase und einem radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotid, das komplementär zum Exon 2 der Intronhaltigen (prä-) U3 RNA ist (Abb. 43 A und B). Die Mengen an ungespleißten prä-U3 RNAs und gespleißter U3 RNA im Extrakt können anhand der relativen Mengen der Produkte der Extensions-Reaktion analysiert werden.

Beide Hefestämme (AGY22 und AGY23) zeigten bei Inkubation in Glukose-haltigem Medium keinen ungewöhnlichen Wachstumsdefekt und stellten die Zellteilung auch nach langen Inkubationszeiten (>100 h) nicht ein. Die Analyse der Extensionsprodukte ergab jedoch in beiden Fällen, bei Repression von *SPP381* (Abb. 43 A) und *SNU23* (Abb. 43 B) durch Glukose, eine Akkumulation ungespleißter prä-U3 RNAs (Isoformen A und B). Die Menge an akkumulierenden prä-U3 RNAs war jedoch vergleichsweise gering und wurde erst nach verhältnismäßig langen Depletionszeiten beobachtet (27 bzw. 22 Stunden). Dagegen führt z.B. die Depletion des essentiellen U5 snRNP-Proteins Snu114p schon nach 2 Stunden zu einer sehr starken Akkumulation von prä-mRNA [38]. Dennoch tragen Spp381p und Snu23p zur Effizienz der Spleißreaktion *in vivo* bei. Auch in Abwesenheit der Proteine scheint aber noch genügend Spleißaktivität erhalten zu sein, um die Vitalität der Zellen zu gewährleisten, so daß die beiden Proteine womöglich nicht essentiell für das vegetative Wachstum sind. Es ist jedoch auch möglich, daß die Repression der Proteine in Glukose nur unvollständig war. Wenn diese kleinen Proteine zusätzlich noch sehr stabil sind, könnte selbst bei langen Depletionszeiten eine genügend große Konzentration der Protein erhalten bleiben, um die benötigte Funktion im Spleißen aufrecht zu erhalten.

4.4.9 Snu66p und Snu23p, jedoch nicht Spp381p, sind *in vitro* stabil mit Spleißosomen assoziiert

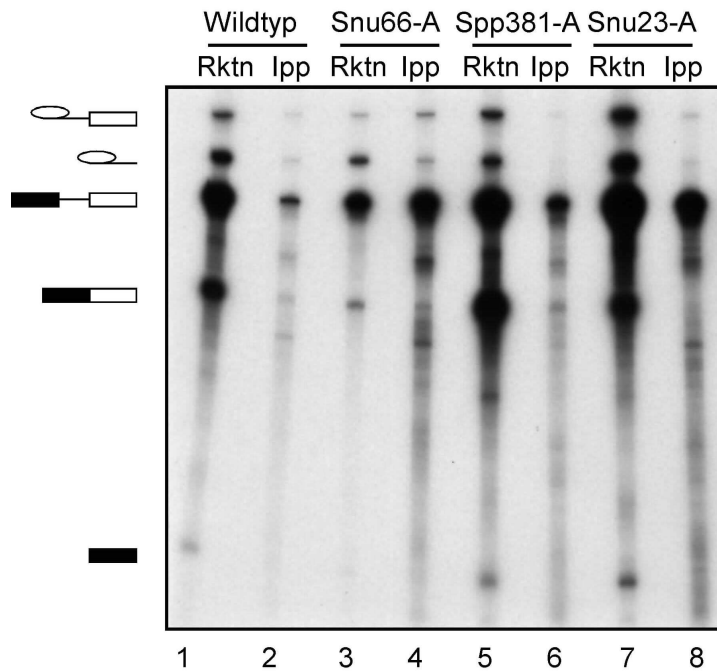
Snu66p, Spp381p und Snu23p sind mit dem [U4/U6.U5] tri-snRNP assoziiert und, direkt (Snu66p) oder zumindest unterstützend (Spp381p und Snu23p), an der prä-mRNA Spleißreaktion beteiligt. Die Phänotypen, die durch die Depletion von Spp381p und Snu23p *in vivo* hervorgerufen werden, könnten aber auch indirekt verursacht werden. Die Proteine könnten an der Biosynthese von snRNPs oder deren Komponenten, aber nicht direkt an der Spleißreaktion selbst beteiligt sein. Für Snu66p konnte eine Spleißinhibition vor dem ersten Katalyseschritt *in vitro* gezeigt werden. Diese könnte aber auch durch eine Inhibition der Spleißosomassemblierung verursacht sein. Deshalb war es wichtig, eine direkte Beteiligung

von Snu66p, Spp381p und Snu23p an der Spleißreaktion oder der Spleißosomenassemblierung nachzuweisen. Hierzu wurde deren Assoziation mit dem Spleißosom *in vitro* untersucht.

Es wurden zwei verschiedene experimentelle Ansätze verwendet. Zunächst wurde durch eine einfache Immunpräzipitation der Proteine aus einer *in vitro* Spleißreaktion überprüft, ob sie stabil mit der prä-mRNA oder davon abgeleiteten Spleißprodukten (und somit dem Spleißosom) assoziiert sind. Dieses Experiment kann Aufschluß darüber geben, bis zu (bzw. ab) welchem Schritt der Spleißreaktion die Proteine involviert sind. Die Immunpräzipitation über das Protein A Tag könnte aber die Wechselwirkung der Proteine mit dem Spleißosom stören. Um dies zu verhindern, wurden im zweiten Experiment Spleißosomen *in vitro* auf einer biotinylierten prä-mRNA assembliert und dann über Streptavidin-Agarose gereinigt [145]. Durch Western Blot-Analyse wurde dann untersucht, ob die Proteine Bestandteil der Affinitäts-gereinigten Spleißosomen sind.

Spleißreaktionsmischungen wurden mit den Snu66-protAp-, Spp381-protAp- oder Snu23-protAp-haltigen Extrakten, oder einem Wildtyp-Extrakt, der kein protA-Fusionsprotein enthielt, in elf-fachen Ansätzen pipettiert. Die Ansätze wurden mit der entsprechenden Menge an radioaktiv markierter Aktin prä-mRNA für 25 min inkubiert. Jeweils 1/11 der Reaktionsmischungen wurde danach für die übliche Analyse der Spleißreaktion abgenommen, aus dem Rest wurde mit IgG-Agarose in Puffer NET-2 in Gegenwart von 150 mM Salz immunpräzipitiert. Anschließend wurde analysiert, ob die prä-mRNA oder davon abgeleitete Spleißintermediate und -produkte mit den Proteinen kopräzipitiert wurden; der RNA-Gehalt der Präzipitate wurde mit den Spleißreaktions-Kontrollen verglichen (Abb. 44).

Mit Snu66p und Snu23p wurden signifikante Mengen der prä-mRNA kopräzipitiert (Spuren 4 und 8), während mit Spp381p kaum mehr als Hintergrundmengen von prä-mRNA präzipitiert wurden (Spur 6; vergleiche mit der Wildtyp-Kontrolle in Spur 2). Mit Snu66p wurden zusätzlich noch geringe, aber signifikante Mengen des Intron-Lariat-Exon2 Intermediats und des Intron-Lariats, aber nicht die gespleißte mRNA kopräzipitiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Snu66p während der ganzen Spleißreaktion mit dem Spleißosom assoziiert bleibt, während Snu23p nur während der Assemblierungsphase des Spleißosoms direkt oder indirekt mit der prä-mRNA interagiert. Snu23p könnte das Spleißosom jedoch verlassen, wenn dieses aktiviert wird. Spp381p scheint diesen Resultaten zufolge überhaupt nicht stabil mit dem Spleißosom assoziiert zu sein. Die beiden letzteren Proteine könnten aber auch aufgrund konformationeller Änderungen im Spleißosom oder durch die Assemblierung des tri-snRNPs mit dem Prä-Spleißosom so maskiert sein, daß die Protein A Tags für direkte Immunpräzipitation des entsprechenden Proteins nicht mehr zugänglich sind. Um dies zu klären, wurde die oben skizzierte Affinitätsreinigung von Spleißosomen mittels biotinylierter prä-mRNA durchgeführt.



wurden, auf ein denaturierendes Harnstoff-Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die radioaktiv markierten RNA-Spezies durch Autoradiographie analysiert (links indiziert; vgl. Abb. 41).

Abb. 44: Koimmunpräzipitation von radioaktiv markierter prä-mRNA mit tri-snRNP-spezifischen Proteinen aus Spleißreaktionen *in vitro*

In vitro Spleißreaktionen wurden mit je 22 µl Extrakt und 110.000 cpm radioaktiv markierter prä-mRNA angesetzt (je 55 µl Gesamtvolumen). Es wurden Wildtyp-Extrakt (Spur 1) bzw. Extrakte, die ProtA-fusionierte Proteine enthielten, verwendet: Snu66-protAp, Spp381-protAp oder Snu23-protAp (in Spuren 3, 5 und 7). Nach 25 min Inkubationszeit wurden je 5 µl der Reaktionsmischungen abgenommen, um die Bildung der Spleißprodukte zu analysieren (ungeradzahlige Spuren; "Rktn"). Die restlichen 50 µl Reaktionsmischung wurden mit IgG-Agarose präzipitiert, die aus den Präzipitaten extrahierten RNAs wurden in den geradzahlichen Spuren ("Ipp"), jeweils rechts neben den Proben, die aus den Gesamtreaktions-Mischungen extrahiert

Dazu wurde zunächst biotinylierte prä-mRNA hergestellt (siehe Kapitel 3.2.2.10). Diese prä-mRNA wurde mit etwa 80% Ausbeute auf Streptavidin-Agarose gebunden (nicht gezeigt). Spleißreaktionen wurden, wie oben beschrieben, mit den gleichen Extrakten angesetzt, zur Kontrolle wurden jeweils parallel Ansätze mit nichtbiotinylierter und mit biotinylierter prä-mRNA mitgeführt. Nach 25 min Inkubationszeit wurden die prä-mRNA und die darauf assemblierten Spleißosomen mit Streptavidin-Agarose präzipitiert und gewaschen (Puffer NET-2 150). Anschließend wurden die Proteine und die snRNAs aus den Präzipitaten extrahiert und separat durch Western- oder Northern Blot-Analyse identifiziert (Abb. 45).

Aus allen Extrakten wurden mit der biotinylierten prä-mRNA (jedoch nicht mit der unmodifizierten prä-mRNA) vergleichbare Mengen von snRNPs kopräzipitiert (Abb. 45 C; geradzahlige Spuren). Die Präzipitate enthielten U2, U1, U5 und U6 snRNPs. Da U1 snRNPs in dem Präzipitat vorhanden waren, ist nicht auszuschließen, daß außer Spleißosomen auch Prä-Spleißosomen mit der prä-mRNA koisoliert wurden. Weil die U4 snRNA nicht präzipitiert wurde, müssen die präzipitierten Spleißosomen bereits aktiviert sein (siehe Einleitung). Zusätzlich konnte durch Western Blot-Analyse das U5 snRNP-Protein Snu114p in allen Präzipitaten mit biotinylierter prä-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 45 B). Dies deutet nochmals auf die spezifische Isolierung von Spleißosomen hin (Snu114p ist nicht Teil von Prä-Spleißosomen). Von den ProtA-fusionierten Proteine konnten nur Snu66p und Snu23p, nicht jedoch Spp381p als stabil assoziierte Bestandteile des aktivierten Spleißosoms nachgewiesen werden (Abb. 45 A).

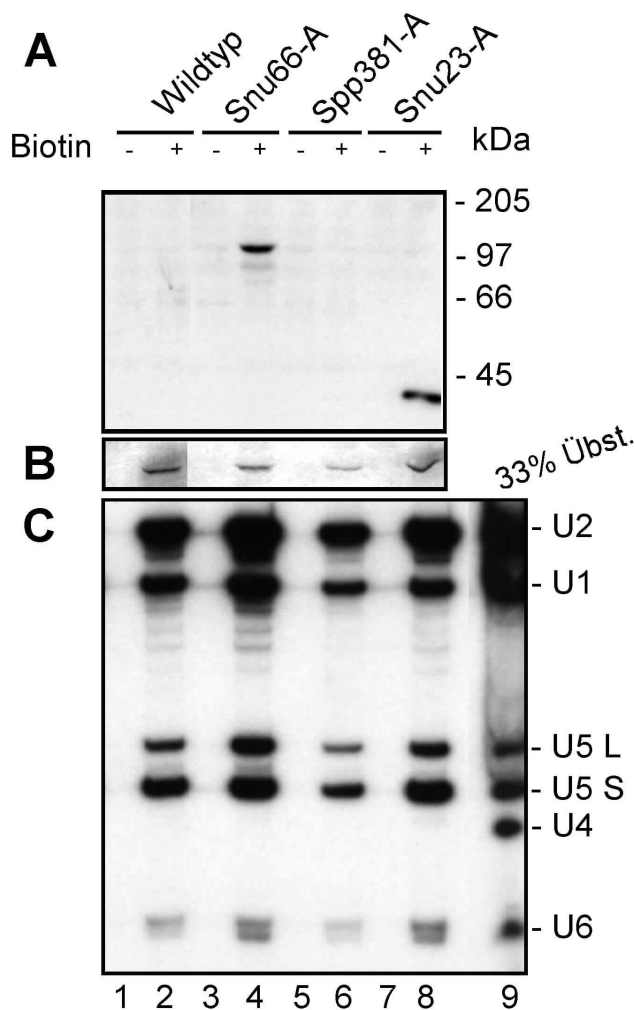


Abb. 45: Snu66p und Snu23p sind Bestandteil affinitätsgeinigter, aktivierter Spleißosomen

Spleißosomen wurden *in vitro* auf biotinylierter Aktin prä-mRNA assembliert und dann mit Streptavidin-Agarose präzipitiert. Es wurden Wildtyp-Extrakt (Spur 1 und 2), oder Snu66-protAp- (3 und 4), Spp381-protAp- (5 und 6) und Snu23-protAp-haltige (7 und 8) Extrakte verwendet. Die Extrakte wurden entweder mit biotinylierter prä-mRNA inkubiert (geradzahlige Spuren) oder zur Kontrolle mit nichtbiotinylierter prä-mRNA (ungeradzahlige Spuren). Die präzipitierten Spleißosomen wurden auf ihre Bestandteile analysiert. **A:** Proteine wurden aus den Präzipitaten extrahiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot-Analyse wurden die protA-fusionierten Proteine nachgewiesen. Die Positionen von Molekulargewichtsmarkern sind rechts angegeben. **B:** Western Blot-Analyse der gleichen Membran wie in A mit α -Snu114p Antiserum. **C:** Die snRNAs wurden ebenfalls aus den Präzipitaten extrahiert und nach Auftrennung durch denaturierende Harnstoff-PAGE mit einem Northern Blot analysiert (mit DNA-Sonden die spezifisch mit den U1, U2, U4, U5 und U6 snRNAs hybridisieren; jeweils 20×10^6 cpm). Die Identität der snRNAs ist rechts angegeben. In Spur 11 ist das Äquivalent von einem Drittel des Überstandes der Präzipitation in Spur 2 aufgetragen, um zu zeigen, daß die U4 snRNA-Sonde funktionell ist.

Zusammen mit den im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Resultaten zeigt dies, daß Snu66p während der gesamten Dauer der Spleißreaktion stabil mit dem aktivierten Spleißosom assoziiert ist. Snu23p ist ebenfalls stabil assoziierter Bestandteil des aktivierten Spleißosoms, zumindest vor der Katalyse des ersten Schrittes der Spleißreaktion (eine Assoziation von Snu23p mit Produkten des ersten Transesterifizierungsschrittes ist nicht nachweisbar). Snu23p könnte zwar nur mit dem Prä-Spleißosom assoziiert sein, dies ist jedoch unwahrscheinlich, da das Protein im Extrakt mit dem tri-snRNP assoziiert ist (siehe Abb. 38). Spp381p schließlich scheint weder signifikant mit der prä-mRNA assoziiert zu sein, noch ist es Bestandteil des aktivierten Spleißosoms. Dennoch ist es mit dem tri-snRNP assoziiert. Spp381p könnte daher bei der Assemblierung des Spleißosoms eine Rolle spielen, jedoch vor oder während des Aktivierungsschrittes (Übergang von Komplex A2-1 zu Komplex A1), bei dem das U4 snRNP das Spleißosom verläßt, ebenfalls vom Spleißosom abdissoziieren (vgl. Einleitung). Der Übergang zwischen diesen beiden Komplexen ist sehr schnell. Für Proteinfaktoren, die erst mit dem tri-snRNP in das Spleißosom eintreten, aber zum Zeitpunkt der Aktivierung bereits wieder vom Spleißosom abdissoziieren (wie z.B. das

U4 snRNP-assoziierte Prp4p), ist keine Assoziation mit der prä-mRNA nachweisbar, wenn dieser Schritt nicht kinetisch verlangsamt wird [180]. Dies kann durch Erniedrigung der ATP-Konzentration im Reaktionsansatz erreicht werden. Ein solches Experiment (analog zu dem in Abb. 44) resultierte tatsächlich in einer geringen Verstärkung der Kopräzipitation der prä-mRNA mit Spp381p (nicht gezeigt). Lybarger und Mitarbeiter [177] haben eine genetische Interaktion und eine gewisse Redundanz der Funktionen von Spp381p und Prp38p nachgewiesen. Prp38p ist an dem spleißosomalen Aktivierungsschritt beteiligt: In einer Temperatursensitiven Prp38p Mutante dissoziiert das U4 snRNP nicht mehr vom Spleißosom ab [98]. Spp381p könnte also zusammen mit Prp38p an dem Aktivierungsschritt beteiligt sein und gleichzeitig mit dem U4 snRNP das Spleißosom verlassen.

4.4.10 Zusammenfassung

Ebenso wie das U1 snRNP konnte auch das 25S [U4/U6.U5] tri-snRNP aus der Hefe isoliert und seine Proteinzusammensetzung charakterisiert werden. Hier sind mehr Gemeinsamkeiten mit dem humanen Gegenstück zu beobachten, als beim U1 snRNP (siehe Diskussion). Es konnten fünf neue Proteine als spezifisch assoziierte Bestandteile des tri-snRNPs identifiziert werden. Signifikanterweise wurden im gereinigten tri-snRNP aber auch die mit dem U6 snRNP assoziierten Lsm Proteine gefunden, inklusive vier neuer Lsm Proteine, deren Assoziation mit dem tri-snRNP hier erstmals gezeigt wurde. Die Funktionen der neuen spezifischen Proteine wurden durch verschiedene Methoden *in vitro* und *in vivo* untersucht. Drei der neuen Proteine (Snu66p, Spp381p und Snu23p) assoziieren nicht nur mit dem tri-snRNP, sondern auch mit einem tetrameren Komplex, der aus U2, U4, U6 und U5 snRNPs besteht. Snu66p und Snu23p sind Bestandteile des aktiven Spleißosoms, während Spp381p seine Funktion wohl nur während der Assemblierung und/oder Aktivierung des Spleißosoms ausübt.

4.5 Das [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNP ist ein dynamischer Komplex

In Kapitel 4.4.6 konnte gezeigt werden, daß Snu66p, Spp381p und Snu23p mit dem tri-snRNP, aber auch mit einem [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNP assoziiert sind (siehe Abb. 38 und Abb. 39). Die Existenz eines tetrameren snRNP-Komplexes gleicher Zusammensetzung wurde bereits früher von beschrieben [110]. Diese Autoren konnten ein tetra-snRNP mit dem tri-snRNP-Protein Brr2p/Snu246p kopräzipitieren. Auch mit den U5 snRNP-spezifischen Proteinen Snu114p und Prp8p können, erstaunlicherweise selbst bei erhöhten Salzkonzentrationen, neben dem tri-snRNP signifikante Mengen an U2 snRNPs aus Gesamtzellextrakten kopräzipitiert werden (siehe Abb. 46).

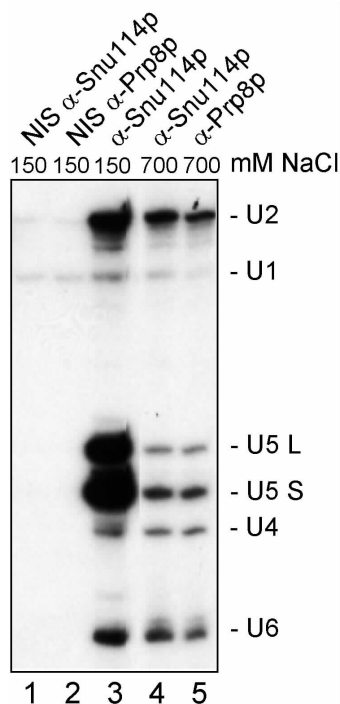


Abb. 46: [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNPs werden auch mit Snu114p und Prp8p kopräzipitiert

Spezifische Antiseren, die gegen die [U4/U6.U5] tri-snRNP-spezifischen Proteine Snu114p und Prp8p gerichtet sind, wurden an Protein A Sepharose gekoppelt und dann zur Immunpräzipitation eines Wildtyp-Extraktes verwendet. Zur Kontrolle wurde auch mit Antikörpern aus Prä-Immunsereum präzipitiert. Die Präzipitate wurden mit Waschpuffern verschiedener Salzkonzentration gewaschen. Die kopräzipitierten snRNAs wurden dann extrahiert, durch Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen auf einem 8% Acrylamid-/ 8M Harnstoff-Gel aufgetrennt und durch einen Northern Blot analysiert (mit Sonden gegen die U1, U2, U4, U5 und U6 snRNAs; je 20×10^6 cpm). Salzkonzentration in Spuren 1-3: 150 mM NaCl; in Spuren 4 und 5: 700 mM NaCl. Spuren 1, 2: Präimmunsereum; Spuren 3, 4: anti-Snu114p Antiserum; Spur 5: anti-Prp8p Antiserum.

Die Immunpräzipitation von tetra-snRNPs mit Snu66p, Spp381p und Snu23p war dagegen nur bei geringen Salzkonzentrationen zu beobachten. Dies liegt vermutlich an der schwachen Assoziation dieser Proteine mit dem tri-snRNP. Das tetra-snRNP selbst könnte dagegen ein stabiles Partikel sein. Allerdings sind die in Gegenwart von 700 mM Salz im Puffer kopräzipitierten Mengen an tetra-snRNP mit Snu114p und Prp8p deutlich geringer als bei 150 mM Salz (in Abb. 46 nur für Snu114p gezeigt).

4.5.1 Snu66p, Spp381p und Snu23p dissoziieren bei Inkubation des Extraktes mit ATP reversibel vom [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNP ab

Die Natur des tetra-snRNPs ist bislang ungeklärt. Seine Bildung könnte auf einer Affinität von Proteinen der U2 und tri-snRNPs zueinander beruhen, die zwar nur im Kontext des Spleißosoms eine funktionelle Bedeutung haben, aber auch in Abwesenheit von prä-mRNA bestehen können. Alternativ könnte es sich bei diesem Partikel um ein funktionelles

(noch nicht charakterisiertes) Intermediat der Spleißosomassemblierung handeln. Es ist auch denkbar, daß die tetra-snRNPs Spleißosomen sind, die auf einer bestimmten Stufe der Assemblierung oder Aktivierung blockiert wurden. Um die Bestandteile dieser blockierten Spleißosomen für neue Runden der prä-mRNA Spleißreaktion verfügbar zu machen, könnte eine energieabhängige Konformationsänderung oder Dissoziation nötig sein. Daher wurde untersucht, ob eine Inkubation des Extraktes mit ATP zu einer Veränderung des Assoziationsverhaltens von Snu66p, Spp381p und Snu23p mit den Bestandteilen des tetra-snRNPs führt.

Extrakte, die Snu66-protAp, Spp381-protAp oder Snu23-protAp enthielten, sowie ein Wildtyp-Extrakt, der kein protA-fusioniertes Protein enthielt, wurden unter Spleißbedingungen, jedoch ohne prä-mRNA inkubiert. In parallelen Ansätzen wurden die Extrakte ohne ATP und mit 2 mM ATP Endkonzentration behandelt, bevor sie mit IgG-Agarose präzipitiert wurden. Ein jeweils dritter Ansatz wurde zuerst mit 2mM ATP inkubiert, anschließend wurde das ATP in diesen Mischungen durch Zugabe von Glukose depletiert (Glukose wird im Extrakt durch Hexokinase unter ATP-Verbrauch phosphoryliert). Die kopräzipitierten snRNAs wurden wie üblich durch einen Northern Blot analysiert (Abb. 47).

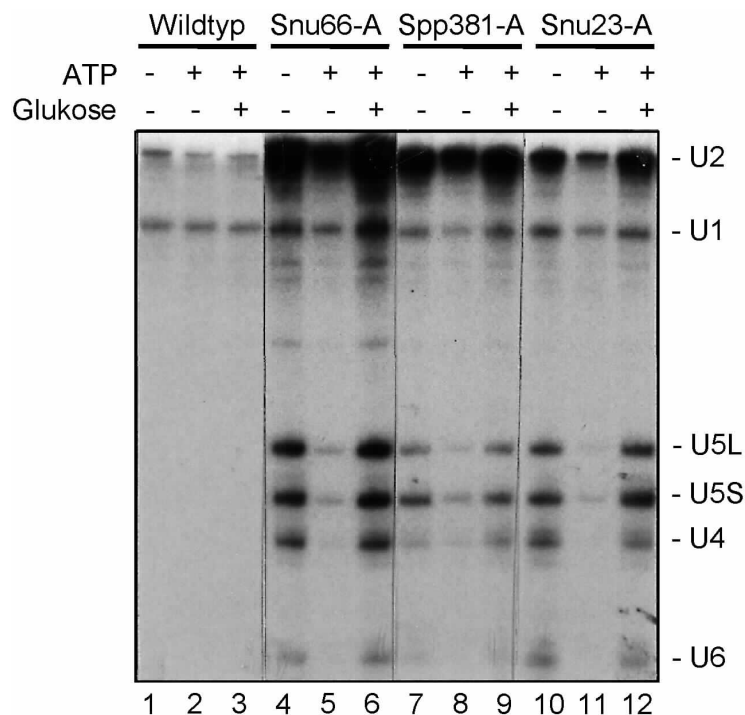


Abb. 47: Snu66p, Spp381p und Snu23p dissoziieren induziert durch ATP in reversibler Weise vom tetra-snRNP ab

Je 50µl Extrakt (Spuren 1-3: Wildtyp; 4-6: Snu66-protAp; 7-9: Spp381-protAp; 10-12: Snu23-protAp) wurden unter Spleißbedingungen für 30 min bei 23°C inkubiert, bevor sie mit IgG-Agarose präzipitiert wurden. Die Extrakte wurden wahlweise ohne ATP (Spuren 1, 4, 7, 10), mit 2 mM ATP (2, 5, 8, 11) oder 2 mM ATP und anschließend nochmal 30 min. mit 10 mM Glukose inkubiert (Spuren 3, 6, 9, 12). Die Präzipitate wurden mit NET-2 100 Puffer gewaschen und die snRNAs extrahiert. Diese wurden auf einem denaturierenden Harnstoff-Gel aufgetrennt und durch Northern Blot (mit UsnRNA-spezifischen Sonden) analysiert.

Die Inkubation der Extrakte mit ATP führte zu einer deutlichen Reduzierung der Präzipitation von U2 und tri-snRNPs mit allen drei Proteinen (Abb. 47; vergleiche die Spuren 4 und 5, 7 und 8, 10 und 11), wobei die Assoziation der Proteine mit dem U2 snRNP weniger stark beeinflusst wurde. Die Präzipitation von U2, U5, U4 und U6 snRNPs war für jedes der drei Proteine spezifisch: Aus dem Wildtyp Extrakt wurden jeweils nur Hintergrundmengen an

U2 und U1 snRNPs, sowie gar keine U5, U4 und U6 snRNPs präzipitiert (Spuren 1-3). Die nachfolgende Depletion von ATP durch Hexokinase und Glukose führte bei allen drei Proteinen zu einer Reassoziaton mit dem tetra-snRNP. Alle vier tetra-snRNP Untereinheiten wurden im gleichen Maße wie vor der ATP-Inkubation präzipitiert (vergleiche die Spuren 4 und 6, 7 und 9, 10 und 12).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß Snu66p, Spp381p und Snu23p aufgrund einer ATP-induzierten Konformationsänderung des tetra-snRNPs von diesem Partikel in reversibler Weise abdissoziieren. Anscheinend haben die Proteine unter diesen Umständen eine Affinität zum U2 snRNP, auch wenn diese im Vergleich zur Inkubation ohne ATP z.T. deutlich reduziert ist. Es ist also nicht klar, ob nur diese drei Proteine vom tetra-snRNP abdissoziieren, oder ob die ATP-induzierte Konformationsänderung zur Dissoziation weiterer Proteine oder gar des gesamten tetra-snRNPs in seine Untereinheiten führt. Dieses könnte möglicherweise an isolierten tetra-snRNPs untersucht werden.

4.5.2 Isolierte [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNPs dissoziieren bei Inkubation mit ATP in freie U2, U5, U4/U6 und teilweise freie U4 und U6 snRNPs

Dazu wurde das [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNP zunächst aus den Extrakten, welche die Fusionsproteine Snu66-protAp, Spp381-protAp oder Snu23-protAp enthielten, mit IgG-Agarose kopräzipitiert und gewaschen. Anschließend wurde die IgG-Agarose mit den darauf gebundenen tetra-snRNPs unter Spleißbedingungen mit 2 mM ATP für 20 min bei 23°C inkubiert. Die resultierende Mischung wurde dann mit Puffer aufgefüllt und der Überstand wurde in drei Teile aufgeteilt. Sollte das isolierte tetra-snRNP durch die ATP-Inkubation ganz oder teilweise dissoziiert sein, so müßten sich die abdissoziierten snRNPs im Überstand durch Northern Blot-Analyse nachweisen lassen. Dazu wurden snRNAs aus einem Drittel des Überstandes extrahiert. Das zweite Drittel des Überstandes wurde dazu verwendet, den Zustand der Basenpaarung der (möglicherweise freigesetzten) U4 und U6 snRNPs zu untersuchen. Dazu wurde der Überstand bei 4°C mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, da unter diesen Bedingungen die Basenpaarung der snRNAs erhalten bleibt, während die Proteine abgelöst werden. Die isolierten snRNAs wurden auf einem nicht-denaturierenden Acrylamid-Gel aufgetrennt, so daß die U4/U6 RNA-Duplex erhalten blieb. Durch Northern Blot wurde dann nacheinander mit Sonden, die zur U4 oder U6 snRNA komplementär sind, der Status der U4/U6 Basenpaarung analysiert. Das letzte Drittel des Überstandes wurde mit anti-Snu114p Antikörpern immunpräzipitiert. Durch Analyse der hierbei kopräzipitierten snRNAs sollte sich zeigen lassen, ob sich im Überstand freigesetzte U5 snRNPs befinden, und ob diese noch immer mit U4, U6 oder U2 snRNPs assoziiert sind.

Schließlich wurde auch der Überstand dieser zweiten Immunpräzipitation auf seinen Gehalt an nicht-präzipitierten snRNPs untersucht (Abb. 48 A-C).

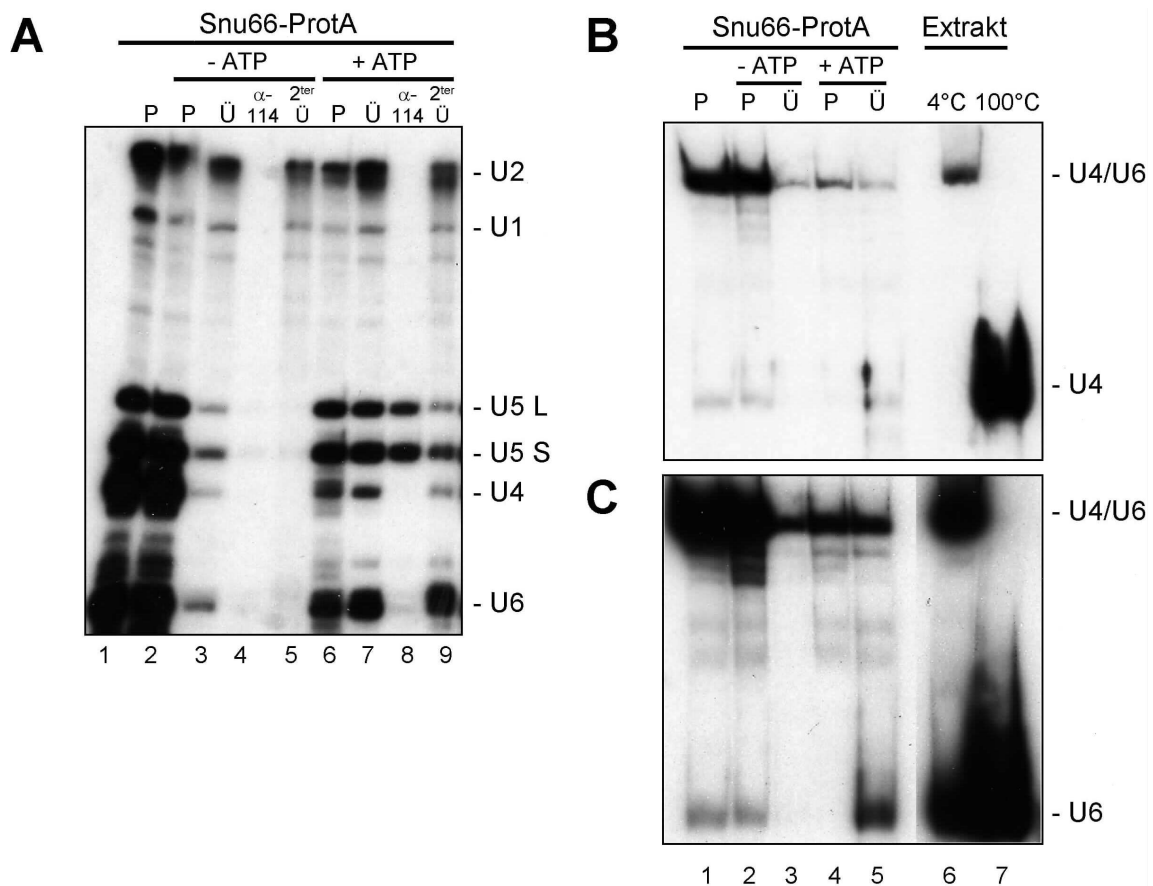


Abb. 48: Das isolierte tetra-snRNP dissoziiert bei ATP-Inkubation in freie U2, U5, U4 und U6 snRNPs

A: Northern Blot Analyse der unten beschriebenen snRNP Fraktionen mit radioaktiv markierten Sonden gegen die U1, U2, U4, U5 und U6 snRNAs. **B:** U4 snRNAs wurden aus den unten beschriebenen Fraktionen unter Bedingungen, die die Basenpaarung mit U6 snRNA nicht zerstören, isoliert, durch native Gelelektrophorese aufgetrennt und mit U4 snRNA-spezifischen Sonden im Northern Blot analysiert. **C:** Die Blot-Membran aus B wurde nach Dehybridisierung mit Sonden gegen U6 snRNA analysiert. 400 µl Snu66-protAp-Extrakt wurden mit 160 µl IgG Agarose in Puffer NET-2 100 präzipitiert und die isolierten [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNPs wurden mit NET-2 100 gewaschen. Spur 1: 40 µl des Präzipitates wurden je zur Hälfte für die Analyse der kopräzipitierten snRNAs unter dentaunierenden (A) oder nativen Bedingungen (B, C) verwendet. Das restliche Präzipitat wurde halbiert und unter Spleißbedingungen wurde je ein Hälfte ohne, die andere Hälfte mit 2 mM ATP inkubiert, dann wurden die Präzipitate mit 1500 µl Puffer aufgefüllt. Die snRNAs von je 1/3 der Präzipitate sowie von 1/3 der Überstände wurden per Northern Blot analysiert; in A: Spuren 2 & 3 (-ATP) sowie 6 & 7 (+ATP). Die U4 und U6 snRNAs aus je einem weiteren Drittel der Präzipitate und Überstände wurden im nativen Zustand analysiert; in B & C: Spuren 2 & 3 (-ATP) sowie 4 & 5 (+ATP). Das letzte Drittel der Überstände wurde mit Protein-A Sepharose-gekoppelten anti-Snu114p Antikörpern immunpräzipitiert, gewaschen und die Präzipitate sowie Überstände dieser Reaktion wurden wiederum auf ihren Gesamtgehalt an snRNAs untersucht; in A: Spuren 4 & 5 (-ATP) sowie 8 & 9 (+ATP). In den Spuren 6 & 7 in B und C sind jeweils snRNAs aus einem Gesamtextrakt aufgetragen, die Probe in Spur 7 wurde vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min. auf 100°C erhitzt, um die U4/U6 snRNA-Duplex aufzuschmelzen.

In Abb. 48 ist das Ergebnis dieses Experimentes exemplarisch für Snu66p gezeigt, für Spp381p und Snu23p wurden jedoch im Wesentlichen die gleichen Resultate erhalten: Der isolierte tetra-snRNP-Komplex zerfiel bei Inkubation mit ATP nahezu vollständig in seine Bestandteile (vergleiche in Abb. 48 A, Spuren 2-5 mit 6-9). Zwar blieb nach der Inkubation

mit ATP etwa die Hälfte der tetra-snRNPs auf der IgG-Agarose zurück (vergleiche in Abb. 48 A, Spuren 6 und 7 mit 1), die andere Hälfte der U2, U5, U4 und U6 snRNPs wurde jedoch im Überstand gefunden. Aus diesem Überstand ließen sich mit den anti-Snu114p Antikörpern das freie U5 snRNP, jedoch keine U4 und U6 snRNPs präzipitieren (Spur 8); U2, U4 und U6 snRNPs verblieben im zweiten Überstand (Spur 9). Dies bedeutet, daß das tetra-snRNP nicht nur in die U2 und tri-snRNP Untereinheiten zerfällt, sondern daß darüberhinaus auch das tri-snRNP in seine Untereinheiten dissoziiert. Die Inkubation des isolierten tetra-snRNPs ohne ATP führte nur zu einer geringen Dissoziation (Spuren 2-5 in A).

Die Analyse der Basenpaarung der U4 und U6 snRNAs im tetra-snRNP-Isolat zeigte, daß die U4 und U6 snRNPs größtenteils als dimeres U4/U6 Partikel vorliegen (Abb. 48 B und C, Spuren 1 und 2). Wurde das tetra-snRNP mit ATP inkubiert, so lag das Verhältnis von ungepaarten U4 und U6 snRNAs zu gepaarten U4/U6 snRNAs im Überstand klar auf der Seite der ungepaarten snRNAs (Abb. 48 B und C, Spur 5). Dies wird deutlich, wenn man dieses Verhältnis mit dem entsprechenden Verhältnis im Präzipitat des tetra-snRNPs vergleicht (Abb. 48 B und C, Spur 2). Die (nach ATP-Inkubation) auf der Agarose verbliebenen U4 und U6 snRNPs lagen dagegen überwiegend basengepaart vor (B und C, Spur 4).

Bei allen drei hier untersuchten tetra-snRNP-assoziierten Proteinen (Snu66p, Spp381p und Snu23p) ließ sich das gleiche ATP-induzierte Dissoziationsverhalten beobachten (nur für Snu66p gezeigt). Das gleiche Verhalten konnte auch für tetra-snRNPs gezeigt werden, die mit Brr2p/Snu246p kopräzipitiert wurden [110]. Bei allen vier Proteinen handelt es sich um schwach assoziierte tri-snRNP Proteine, die schon bei moderaten Salzkonzentrationen (ca. 300 mM) von allen snRNPs abdissoziieren.

Um auszuschließen, daß das beobachtete Dissoziationsverhalten spezifisch für eine Subpopulation von snRNP-Partikeln ist, deren Charakteristikum die Assoziation mit diesen schwach gebundenen Proteinen darstellt, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Tetra-snRNPs, die das stabil assoziierte U5 snRNP-Protein Snu114p enthalten, wurden in einem analogen Versuch mit Hilfe von anti-Snu114p Antikörpern isoliert. Bei Inkubation mit ATP zeigten diese tetra-snRNPs die gleiche ATP-induzierte Dissoziation wie Snu66p-assoziierte tetra-snRNPs (Abb. 49 A). Darüberhinaus wurden auch biochemisch isolierte [U4/U6.U5] tri-snRNPs (siehe Kapitel 4.4.1) untersucht, um zu ermitteln, ob die Anwesenheit des U2 snRNPs notwendig für die Dissoziationsreaktion ist. Jedoch auch die mit anti-Snu114p-Antikörpern präzipitierten tri-snRNPs, zerfielen bei Inkubation mit ATP in freie U5, U4 und U6 snRNPs, da im Präzipitat nach ATP-Inkubation keine U4 und U6 snRNAs mehr nachzuweisen waren (Abb. 49 B, siehe insbesondere Spur 4).

Das ATP-Dissoziationsverhalten des tetra-snRNPs scheint also unabhängig davon zu sein, welches Protein zur primären Affinitätsreinigung des Partikels benutzt wird. Dies spricht für eine homogene Population der im Extrakt vorhandenen tetra-snRNPs, die sich nicht durch

unterschiedliche Proteinzusammensetzung unterscheidet. Darüber hinaus scheint die ATP-abhängige Aktivität, welche für die Dissoziation verantwortlich ist, auch im tri-snRNP vorhanden zu sein. Diese Aktivität ist damit nicht abhängig vom Vorhandensein des U2 snRNPs. Raghunathan und Mitarbeiter konnten demonstrieren, daß höchstwahrscheinlich die ATP-abhängige RNA-Helikase Brr2p/Snu246p die Dissoziation der U4 und U6 snRNAs bewirkt [110]. Diese ist auch Teil des tri-snRNPs (s. Kapitel 4.4.2). Die Entwindung der U4/U6-Duplex könnte also eine Dissoziation des gesamten tetra- bzw. tri-snRNPs zu bewirken (siehe Diskussion).

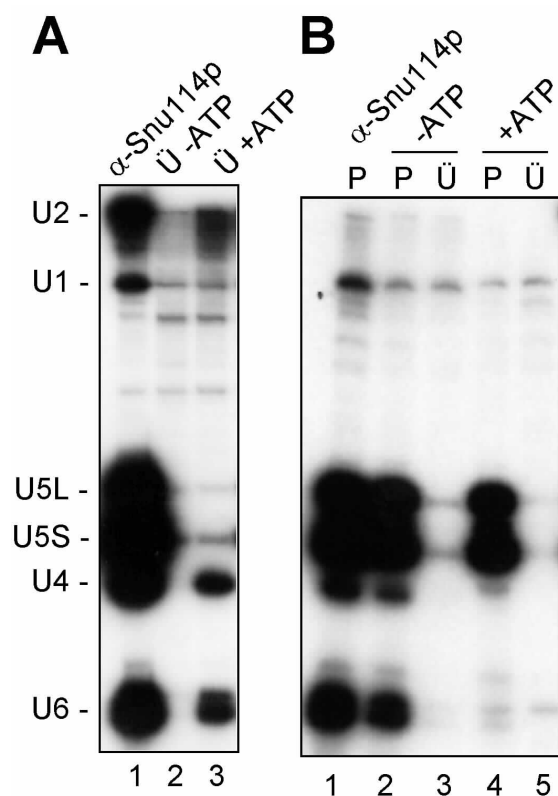


Abb. 49: Auch Snu114p-assoziierte tetra-snRNPs sowie biochemisch isolierte [U4/U6.U5] tri-snRNPs zerfallen bei Inkubation mit ATP

A: [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNPs wurden mit α -Snu114p Antikörpern, die an Protein A Sepharose gekoppelt waren, aus einem Wildtyp-Gesamtzellextrakt immunpräzipitiert. Das Präzipitat wurde mit NET-2 100 gewaschen und in drei Teile geteilt. Die snRNAs aus einem Teil wurden extrahiert und auf ein denaturierendes Harnstoff-Gel aufgetragen (Spur 1), die beiden anderen Teile des Präzipitats wurden ohne (Spur 2) oder mit ATP in Spleißpuffer inkubiert (Spur 3), die Sepharose wurde jeweils mit NET-2 100 Puffer versetzt, die snRNAs aus dem Überstand extrahiert und ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Die Identifikation der snRNAs erfolgte durch Northern Blot-Analyse. **B:** Biochemisch isolierte [U4/U6.U5] tri-snRNPs wurden immunpräzipitiert, wie in A beschrieben. Mit dem Präzipitat wurde wie in A beschrieben verfahren, die entsprechenden Überstände wurden in den Spuren 3 und 5 aufgetragen. Zusätzlich sind aber noch die snRNAs aufgetragen worden, die nach Inkubation und Waschen der Präzipitate aus diesen extrahiert wurden (Spuren 2 und 4). Gelelektrophorese und Northern Blot-Analyse wie in A beschrieben. Die U4 und U6 snRNAs konnten aus dem Überstand nur ineffizient präzipitiert werden (Spur 5).

4.6 Proteinzusammensetzung des freien U5 snRNPs der Hefe

Bei der biochemischen Isolierung des U1 snRNPs (Kapitel 4.3.1) führte der zweite chromatographische Schritt (Ni-NTA) zu einer Koisolierung von U5 snRNPs mit den U1 snRNPs. Diese konnten durch Glyzeringradienten-Zentrifugation von den U1 snRNPs abgetrennt werden. Die Analyse der mit den U5 snRNAs kosedimentierenden Proteine zeigte, daß diese freien U5 snRNPs offenbar nur die Sm Proteine und drei weitere spezifische Proteine enthielten, nämlich Prp8p, Snu114p und Aar2p. Während die ersten beiden Proteine auch essentielle Bestandteile des [U4/U6.U5] tri-snRNPs sind, konnte Aar2p im tri-snRNP nicht nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.4.2). Aar2p ist in der Literatur bereits beschrieben worden [181]. Diese Autoren fanden eine mögliche Beteiligung von Aar2p im Prozeß der Differenzierung der verschiedenen Zellarten der Hefe. Haploide Hefezellen kommen in zwei verschiedenen, sogenannten Paarungstypen vor (**a** und α). So können **a**-Zellen mit α -Zellen verschmelzen und eine diploide Zelle bilden. Aar2p wurde in einem genetischen Screen für Mutationen entdeckt, welche in haploiden Zellen des **a**-Paarungstypus die Unterdrückung von Genen betreffen, die für den α -Paarungstypus spezifisch sind. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß Aar2p am prä-mRNA Spleißen des *MATa1*-Transkriptes, dem eine zentrale Rolle in der Paarungstypus-Differenzierung zukommt, beteiligt ist. Eine Assoziation von Aar2p mit UsnRNPs ist jedoch bisher nicht beobachtet worden. Sie sollte daher hier näher untersucht werden.

4.6.1 Aar2p ist spezifisch mit dem freien U5 snRNP assoziiert

Aar2p wurde als GST-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert und zur Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt, wie in Kapitel 4.3.5.1 für die U1 snRNP-Proteine beschrieben. Das Immuneserum war im Western Blot mit Proteinen aus Gesamtzellextrakt spezifisch für Aar2p (nicht gezeigt) und wurde für Immunpräzipitationsexperimente verwendet (Abb. 50).

Die Northern Blot-Analyse der Immunpräzipitate zeigte, daß Aar2p im Gesamtzellextrakt spezifisch mit einer freien U5 snRNP-Form assoziiert ist (Abb. 50, Spuren 1-3). Bei physiologischer Salzkonzentration (150 mM NaCl) wurden signifikante Mengen von U5L und U5S snRNAs von den anti-Aar2p Antikörpern kopräzipitiert (Spur 1). Die Bindung von Aar2p an das U5 snRNP war spezifisch, da mit dem Prä-Immuneserum keine nennenswerten Mengen an snRNPs präzipitiert wurden (Spur 4) und außer U5 keine andere snRNA in dem Immunpräzipitat zu detektieren war (Spur 1). Im Vergleich zu den snRNPs, die der monoklonale Antikörper H20 aus der gleichen Menge Extrakt präzipitierte (Spur 5), wird deutlich, daß etwa die Hälfte des im Extrakt vorhandenen U5 snRNPs in freier Form und mit

Aar2p assoziiert vorlag (unter der Annahme, daß beide Antikörper die snRNPs gleich effizient präzipitieren). Signifikanterweise wurde mit dem U5 snRNP-Protein Aar2p kein [U4/U6.U5] tri-snRNP kopräzipitiert, in deutlichem Gegensatz zu den U5 snRNP-spezifischen Proteinen Snu114p und Prp8p (vgl. Abb. 46). Bei 400 (Spur 2) oder 700 mM NaCl (Spur 3) im Waschpuffer verbleibt nur noch etwa 1/10 der ursprünglichen Menge an U5 auf der Sepharosematrix, Aar2p dissoziiert bei diesen Salzkonzentrationen vom U5 snRNP also weitgehend ab.

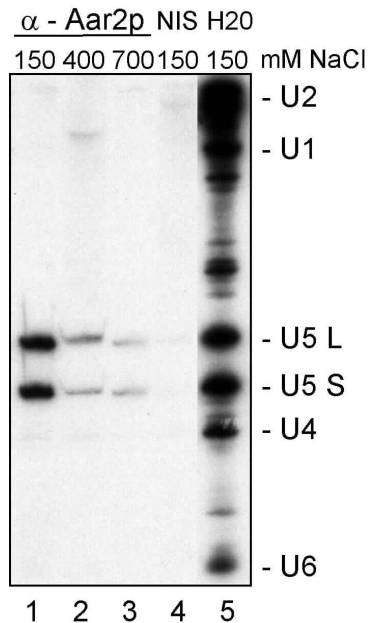


Abb. 50: Das freie U5 snRNP wird aus Hefeextrakt spezifisch mit Antikörpern gegen Aar2p kopräzipitiert

150 µl Hefeextrakt (Stamm BJ2168) wurde mit 60 µl Protein A Sepharose präzipitiert, die vorher mit polyklonalen Antikörpern gegen Aar2p gekoppelt wurde. Das Präzipitat wurde in drei Teile geteilt und jeweils mit Puffer NET-2 mit 150, 400 und 700 mM NaCl gewaschen (Spuren 1-3). 50 µl Extrakt wurden parallel mit Antikörpern aus Prä-Immunserum präzipitiert und mit NET-2 150 gewaschen (Spur 4). Als Positivkontrolle wurden snRNAs aus einem Präzipitat des anti-m₃G-Kappen Antikörpers H2O aufgetragen (Spur 5). Die Präzipitate wurden mit Proteinase K behandelt, die snRNAs extrahiert, durch denaturierende Gelelektrophorese (Harnstoff-PAGE) aufgetrennt und per Northern Blot analysiert (mit radioaktiv markierten DNA-Sonden, die spezifisch mit den Hefe UsnRNAs hybridisieren). Die Identität der snRNAs ist rechts angezeigt.

Die spezifische Assoziation von Aar2p mit dem freien U5 snRNP konnte auch durch ein *in vitro*-Rekonstitutionsexperiment gezeigt werden. Rekombinantes GST-Aar2p wurde an Glutathion-Sepharose gekoppelt, mit Gesamtzellextrakt inkubiert und das gewaschene Präzipitat schließlich auf seinen snRNA-Gehalt hin untersucht (Abb. 51).

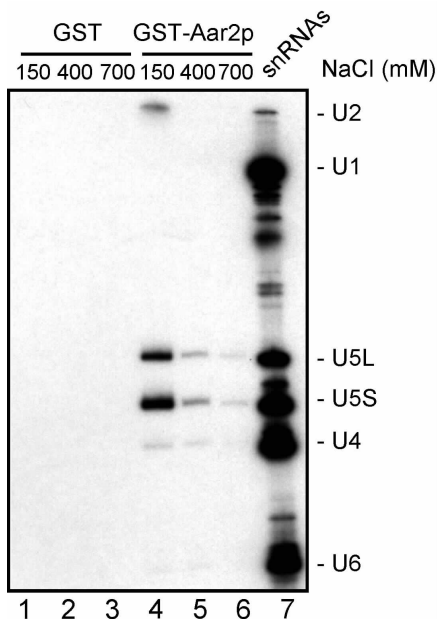


Abb. 51: Rekombinantes GST-Aar2p assoziiert effizient mit dem freien U5 snRNP

1,5 mmol GST-Aar2p wurden an 50 µl Glutathion-Sepharose gekoppelt, mit NET-2 150 Puffer gewaschen, dann mit 135 µl Hefeextrakt (WT, Stamm BJ2168) inkubiert und schließlich mit der Sepharose präzipitiert (Spuren 4-6). Als Negativkontrolle wurde dazu analog GST alleine verwendet (Spuren 1-3). Die Sedimente wurden gedritzelt, mit NET-2 Puffer, die 150, 400 oder 700 mM NaCl enthielten, gewaschen, snRNAs wurden nach Proteinase K-Behandlung extrahiert, durch denaturierende Harnstoff-PAGE aufgetrennt und durch Northern Blot analysiert. Zur Kontrolle wurden snRNAs aus einer Präparation von [U4/U6.U5] tri-snRNPs aufgetragen (Spur 7; vgl. Abb. 28). Die verwendeten Salzkonzentrationen und die Identitäten der snRNAs sind indiziert.

Das rekombinante GST-Aar2p tauschte im Extrakt effizient mit dem endogenen Aar2p aus, so daß das freie U5 snRNP, annähernd so spezifisch wie im Immunpräzipitationsexperiment (Abb. 50), mit der Sepharosematrix präzipitiert wurde (Abb. 51, Spur 4). Das Präzipitat enthielt jedoch auch noch kleine Mengen an U2 (bei 150 mM Salz; Spur 4) und U4/U6 (bei allen getesteten Salzkonzentrationen; Spuren 4-6). Wie das endogene Aar2p, so war auch GST-Aar2p nur bei der niedrigen Salzkonzentration stabil an das U5 snRNP gebunden. Die Assoziation von GST-Aar2p mit dem U5 snRNP war spezifisch, da mit GST alleine keine snRNA kopräzipitiert wurde (Spuren 1-3).

Die Immunpräzipitations- und Rekonstitutionsexperimente in Abb. 50 und Abb. 51 zeigen, daß Aar2p mit einem freien U5 snRNP assoziiert ist. Im Hefeextrakt existiert ein freies U5 snRNP, das man durch Glyzeringradienten-Zentrifugation von [U4/U6.U5] tri-snRNPs abtrennen kann (vgl. Abb. 52 A). Die freien U5 snRNPs sedimentieren jedoch in einem weiten Bereich des Gradienten (5-20 S), so daß vielleicht verschiedene Populationen von U5 snRNPs vorliegen, die sich in ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden. Daher war es von Interesse zu ermitteln, ob Aar2p nur mit einer Teilpopulation von U5 snRNPs assoziiert ist. Ein Gesamtzellextrakt wurde auf einem 10-30% igen Glyzeringradienten aufgetrennt und von oben her in 25 Aliquote fraktioniert. Die Gradientenfraktionen wurden auf ihren snRNA- und Proteingehalt durch Northern (Abb. 52 A) oder Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 52 B).

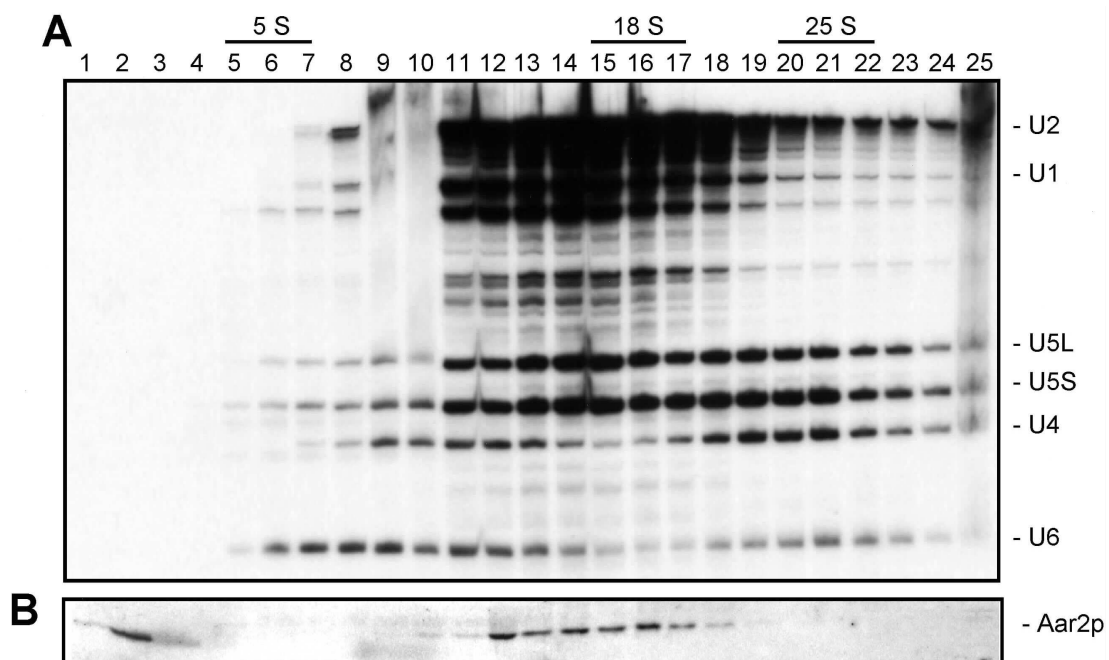


Abb. 52: Aar2p kosedimentiert mit einem freien 15-19S U5 snRNP Partikel

Ein Gesamtzellextrakt wurde auf einem 10-30%igen Glyzeringradienten durch Zentrifugation sedimentiert und fraktioniert. Die RNAs und Proteine der einzelnen Fraktionen wurden nach Extraktion und denaturierender Gelelektrophorese (Harnstoff- bzw. SDS-PAGE) separat analysiert (A: Northern Blot Analyse der snRNAs; B: Western Blot mit dem Antiserum gegen Aar2p (Verdünnung 1:5000)).

U5 snRNAs waren in einem breiten Bereich in den Fraktionen 5-17 zu detektieren (5-20S), mit einem Maximum in Fraktionen 11-16. Dieser breite Sedimentationsbereich der U5 snRNAs deutet die Existenz mehrerer Populationen U5 snRNA-haltiger RNP Partikel an. Die ersten Fraktionen um 5S enthalten vermutlich die freien U5 snRNAs (Frakt. 5-7). Bei ca. 8-12S befinden sich core U5 snRNPs, in welchen die U5 snRNA mit den Sm Proteinen assoziiert ist (Frakt. 8-11). In den Fraktionen 11-17 (12-20S) sedimentieren U5 snRNPs, die bereits mit partikelspezifischen Proteinen assoziiert sein müssen. Das [U4/U6.U5] tri-snRNP sedimentiert in den Fraktionen 18-25, mit einem Maximum in Fraktion 21 (25S). Freie U6 snRNPs finden sich in den Fraktionen 6-8, U4/U6 di-snRNPs in den Fraktionen 9-14 und U1 wie U2 snRNPs haben ihr Maximum bei 17-18S in den Fraktionen 14-16.

Die Western Blot-Analyse der Proteine aus den Gradientenfraktionen mit dem anti-Aar2p Antiserum (Abb. 52 B) zeigte, daß mindestens 3/4 des im Extrakt vorhandenen Aar2p mit U5 snRNPs in den Fraktionen 12-17 (entsprechend 15-19S), kosedimentierten. Der Rest befand sich in Fraktion 2 am oberen Ende des Gradienten in freier Form. Zwar stimmt die Sedimentation von Aar2p gut mit dem Maximum der Sedimentation des freien U5 snRNPs überein, wegen der breiten Verteilung kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß Aar2p mit verschiedenen U5 snRNPs unterschiedlicher Proteinzusammensetzung assoziiert ist. Interessanterweise zeigt das mit dem U1 snRNP biochemisch isolierte U5 snRNP, welches ein in seiner Proteinzusammensetzung homogenes Partikel von 15-18S ist, ein ähnliches Sedimentationsverhalten (siehe Abb. 13). Um Klarheit über die Natur des/der mit Aar2p assoziierten U5 snRNPs zu schaffen, sollten die mit Aar2p assoziierten U5 snRNPs über ein Polyhistidinpeptid am Aar2p Protein spezifisch aufgereinigt und dann im isolierten Zustand untersucht werden.

4.6.2 *In vivo* Fusion von Aar2p mit einem Dekahistidin-Peptid am C-Terminus

Um das mit Aar2p assoziierten U5 snRNP aus einem Gesamt-snRNP-Isolat reinigen zu können, mußte Aar2p mit einem Polyhistidinpeptid versehen werden. Hierzu wurde ein haploider Hefestamm erzeugt, der eine zerstörte Kopie des *AAR2* Gens enthält, jedoch in Galaktose-haltigem Medium ein Aar2p-Dekahistidin-Fusionsprotein überexprimiert (Stamm AGY8; Details siehe unten).

4.6.2.1 *AAR2* ist ein essentielles Gen

Zunächst wurde die Gen-Deletion von *AAR2* in dem diploiden Stamm TR1a/α durchgeführt (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.5.1.2). Dazu wurde das *AAR2* Gen durch PCR aus genomischer Hefe-DNA amplifiziert, in ein Plasmid kloniert und durch Einfügen des *URA3* Markergens zerstört (Plasmid pRS306-*aar2Δ::URA3*). Das

aar2Δ::URA3-Konstrukt wurde aus dem Plasmid isoliert und in dem diploiden Stamm durch homologe Rekombination in den chromosomalen *AAR2* Locus integriert (es resultierte Stamm AGY5). Sporulation und Tetradenanalyse resultierten in nur jeweils zwei lebensfähigen Sporen (Abb. 53 A), die nicht auf SD-Medium ohne Uracil wachsen konnten, also nicht den *URA3*-Marker und somit die Wildtyp-Kopie von *AAR2* enthielten. Die jeweils anderen zwei Sporen teilten sich 6-7 mal (ca. 100 Zellen), aber auch nach 10 Tagen war keine weitere Zellteilung feststellbar.

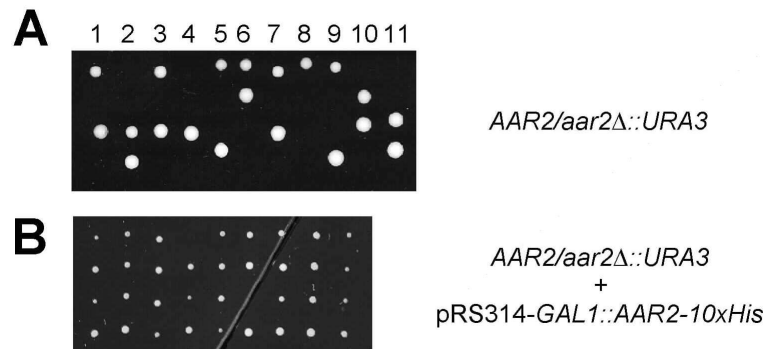


Abb. 53: Die *in vivo* Deletion von *AAR2* erzeugt einen letalen Phänotyp

A: Im diploiden Stamm TR1a/α wurde eine chromosomale Kopie von *AAR2* durch homologe Rekombination eines *aar2Δ::URA3* Konstruktes zerstört, *URA*⁺ Kolonien wurden selektiert (Stamm AGY5), sporuliert und Tetraden wurden vereinzelt. Nur jeweils maximal zwei Sporen bilden Kolonien. Diese Kolonien waren alle *URA*⁻ (durch Replikaplattierung auf SD-Medium ohne Uracil getestet; nicht gezeigt). **B:** Der oben erhaltene Stamm AGY5

(*AAR2/aar2Δ::URA3*) wurde mit einem *TRP1-GAL1::AAR2-10xHis* Plasmid transformiert und positive Klone (*TRP*⁺) wurden auf SD-Galaktose-Platten ohne Tryptophan selektiert (Stamm AGY6). Diese Zellen wurden wiederum sporuliert. In mehreren Fällen überlebten alle vier Sporen. Diejenigen Sporen, die auf Medium ohne Uracil wachsen können (also das zerstörte *aar2Δ::URA3*-Allel tragen), tragen auch den *TRP1* Marker (also das Plasmid, von dem *Aar2-10xHis* exprimiert wird). Dies wurde durch Replikaplattierung auf SD-Galaktose-Platten ohne Tryptophan und Uracil überprüft (nicht gezeigt). Eine solche *URA*⁺/*TRP*⁺-Kolonie wurde isoliert (Stamm AGY8).

Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß es sich bei *AAR2* um ein für vegetatives Wachstum essentielles Gen handelt. Um dies eindeutig zu belegen, mußte gezeigt werden, daß eine Plasmid-kodierte Kopie von *AAR2* den letalen Phänotyp der *aar2*-Deletion beheben kann. Es wurde ein Plasmid erzeugt, welches *AAR2* unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL1* Promotors exprimiert. *AAR2* wurde so in dieses Plasmid hineinkloniert, daß es am 3'-Terminus zehn zusätzliche, für Histidin kodierende Basentriplets enthält (Plasmid pRS314-*GAL::AAR2-10xhis C-Term*; s. Kapitel 3.1.3). Nach Transformation des diploiden Stammes AGY5 mit dem *GAL1::AAR2-10xhis* Plasmid, erneuter Sporulation und Tetradenanalyse auf Galaktose-haltigem Medium wurden mehrfach vier lebensfähige Sporen pro Tetrade erhalten (Abb. 53 B). Jeweils zwei dieser Sporen zeigten eine Kosegregation der *URA3* und *TRP1* Marker, enthielten also gleichzeitig die chromosomale *aar2*-Deletion und das *GAL1::AAR2-10xhis* Plasmid (Stamm AGY8). Dies beweist, daß *AAR2* ein essentielles Gen ist, und daß das *Aar2p* Protein mit dem C-terminalen Dekahistidinpeptid funktionell ist. Dieses klare Ergebnis steht im Widerspruch zu der früheren Beobachtung, daß die Deletion von *AAR2* lediglich einen starken Wachstumsdefekt erzeugt [181]. Möglicherweise läßt sich diese Diskrepanz durch unterschiedliche genetische Hintergründe der verwendeten Hefestämme erklären.

Auch die *in vivo*-Depletion des Proteins durch Abschalten des *GALI* Promotors in Glukose-haltigem Medium führt zum Zelltod (vgl. Kapitel 4.4.8, s. Abb. 54). Allerdings zeigte die Analyse von isolierter Gesamt-RNA aus diesen Zellen durch Primer Extension (Reverse Transkriptase Reaktion; vgl. Kapitel 3.2.5.2) keine Inhibition der Spleißaktivität *in vivo* (nicht gezeigt).

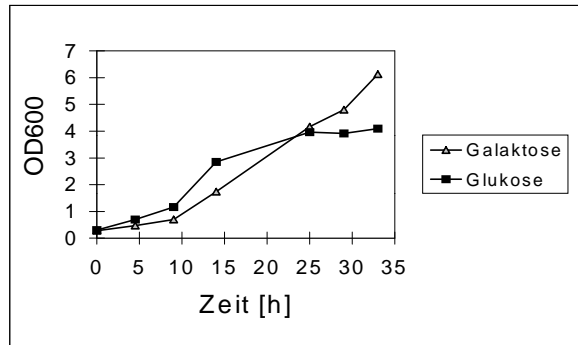


Abb. 54: Die Depletion von Aar2p *in vivo* führt zum Zelltod

Ein haploider Stamm, der Aar2p nur unter der Kontrolle des *GALI* Promotors exprimiert (AGY8), wurde parallel in Galaktose- oder Glukose-haltigem Medium kultiviert. Die optische Dichte O.D.₆₀₀ der Kulturen wurde zu definierten Zeitpunkten bestimmt und gegen diese Zeit in Stunden aufgetragen.

Obwohl Aar2p ein essentielles Protein ist, scheint es nicht essentiell am Spleißen (zumindest der getesteten U3 prä-mRNA) beteiligt zu sein. Möglicherweise hat Aar2p essentielle Funktionen, die nichts mit der Spleißreaktion zu tun haben. Die Depletion des Proteins war nicht vollständig, da sich im Zellysat durch Western Blot noch immer geringe Mengen von Aar2p nachweisen ließen (nicht gezeigt). Dieser Rest an Aar2p könnte ausreichen, um die Funktion von Aar2p im Spleißen zu erfüllen, jedoch nicht genügen, seine möglichen zusätzlichen Funktionen zu unterstützen.

4.6.3 Biochemische Isolierung des Aar2p-assoziierten, freien U5 snRNPs

Nach einigen Versuchen zur Optimierung konnte das freie U5 snRNP, mit welchem das Aar2p Protein assoziiert ist, biochemisch aufgereinigt werden. Die Bedingungen waren die gleichen, wie sie zur Isolierung des U1 snRNP verwendet wurden (s. Kapitel 4.3.1). Allerdings mußten die Zellen zwei Tage lang in YP-Galaktose Medium kultiviert werden, da die Hefe langsamer wächst, wenn Galaktose statt Glukose als Kohlenstoffquelle dient. Die Extraktpräparation und Aufreinigung des Partikels erfolgte bei 200 mM Salz. Die im Eluat der Ni-NTA-Chromatographie vorhandenen RNAs sind in Abb. 55 (Spur 2) gezeigt.

Demnach konnte das freie U5 snRNPs isoliert werden (Abb. 55, Spur 2). Signifikanterweise enthielt das Eluat jedoch auch U1 snRNPs in einem etwa äquimolaren Verhältnis zum U5 snRNP. Die U5 S snRNA ist außerdem wesentlich stärker vertreten, als die U5 L Variante. Wiederum zeigt sich hier eine offenbar spezifische Wechselwirkung zwischen U1 und U5 snRNPs (vgl. die Isolierung von U1 snRNPs, Kapitel 4.3.1, und die Isolierung des [U4/U6.U5] tri-snRNPs, Kapitel 4.4.1). Während bei der Isolierung des U1

snRNPs deutlich mehr U1 als U5 snRNPs aufgereinigt wurden (Abb. 55, Spur 1), liegt hier eine Stöchiometrie von etwa 1:1 vor (Spur 2). Dies ist, geht man von einer spezifischen Interaktion zwischen den U1 und U5 snRNPs aus, am einfachsten dadurch zu erklären, daß U1 im Extrakt im Überschuß über U5 vorliegt.

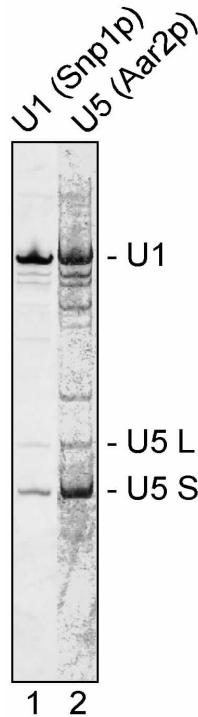


Abb. 55: Das freie U5 snRNP wird über Aar2p-10xHis zusammen mit dem U1 snRNP isoliert

U5 snRNPs, die mit Aar2p assoziiert sind, wurden zusammen mit dem U1 snRNP in einem apparenten 1:1 Verhältnis biochemisch aufgereinigt. Die Reinigung erfolgte, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, in zwei chromatographischen Schritten. Zum Vergleich sind hier folgende Proben auf ein Harnstoff-haltiges Gel aufgetragen, getrennt und mit Silber gefärbt worden: snRNAs aus dem snRNP-Eluat einer Aufreinigung des U1 snRNPs über Snp1-6xHis (Spur 1), sowie snRNAs, die aus dem Ni-NTA-Eluat der Aar2-10xHis-Aufreinigung extrahiert wurden (Spur 2).

Das hier erhaltene Eluat enthielt die gleichen Proteine, die auch in der U1 snRNP-Aufreinigung gefunden wurden. So konnten, nach SDS-PAGE und Silberfärbung, Proteine ausgemacht werden, die das gleiche Laufverhalten aufwiesen, wie die bereits identifizierten U1 snRNP-spezifischen Proteine. Außerdem wurden drei Banden von 216, 114 und 42 kDa, sechs Sm Proteine und zusätzlich das SmB Protein erhalten (nicht gezeigt; vgl. aber Abb. 56).

Das Ni-NTA-Eluat wurde im dritten Reinigungsschritt einer Glyzeringradientenzentrifugation unterworfen (Abb. 56 A und B). Die Analyse der aus den Gradientenfraktionen extrahierten snRNAs ergab eine Auftrennung von U5 und U1 snRNPs, wie sie schon bei der Charakterisierung des U1 snRNPs beobachtet wurde (Kapitel 4.3.1): Das U5 snRNP sedimentierte im wesentlichen zwischen 12 und 18S, während das U1 snRNP sein Sedimentationsmaximum bei 18S hat (Abb. 56 A).

Die Analyse der Proteine der Gradientenfraktionen zeigte, daß das freie U5 snRNP mit den Sm core Proteinen (inklusive dem SmB Protein) und den drei Proteinen von 216, 114 und 42 kDa kosedimentierte (Abb. 56 B). Auch wenn die Proteine hier nicht erneut durch Massenspektrometrie identifiziert wurden, kann aufgrund des Laufverhaltens im SDS-Gel mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, daß es sich um Prp8p, Snu114p und Aar2p handelt. Das koisolierte U1 snRNP sedimentierte mit allen bereits vorher beobachteten U1-spezifischen Proteinen sowie den Sm Proteinen (inklusive SmB) in den 18S Fraktionen.

Durch die Glyzeringradienten-Zentrifugation des U5/U1 Eluats konnte nicht bestätigt werden, daß U5 und U1 snRNPs einen stabilen Komplex miteinander bilden, obwohl geringe Mengen beider snRNPs auch in den Fraktionen um 25S sedimentierten. Die U5 und U1

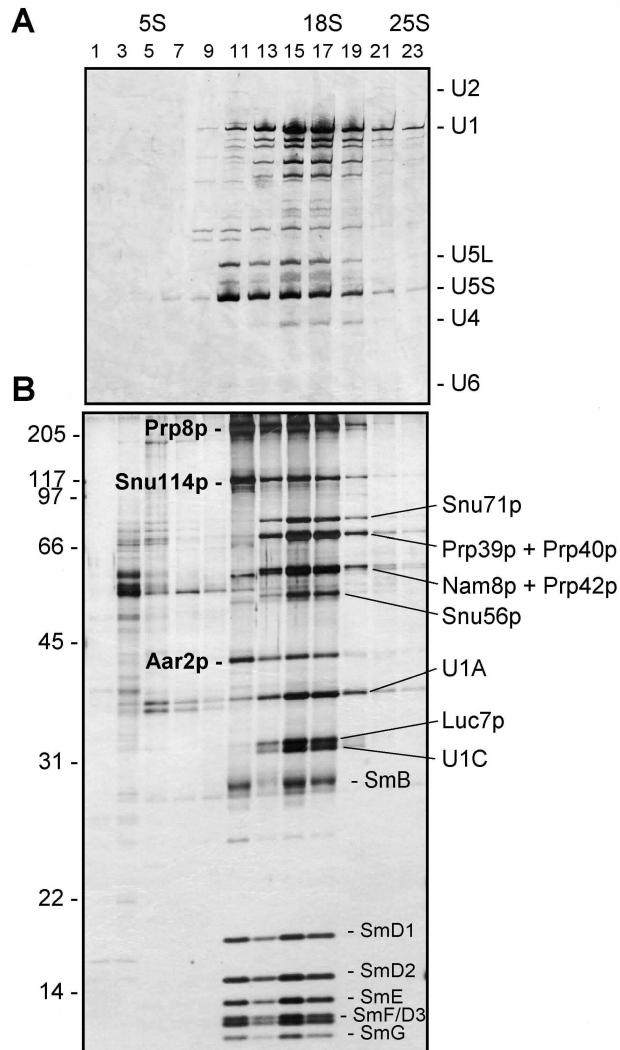


Abb. 56: Glyzeringradientenanalyse des gereinigten U5/U1 snRNP Isolates bei 200 mM KCl

Ein Teil des Ni-Eluates der Aar2p-U5 Aufreinigung wurde durch Zentrifugation auf einem 13 ml 10-30% Glyzeringradienten bei 29.000 U/min für 24 h in einem SW-40 Rotor aufgetrennt. Die Gradientenlösung wurde von oben her in 24 Fraktionen aliquotiert und jede ungerade Fraktion wurde nach Extraktion durch denaturierende Harnstoff- bzw. SDS-PAGE und Silberfärbung auf ihren RNA- (A) und Proteingehalt (B) hin analysiert. Ribosomale RNAs dienten in einem parallel mitgeführten und analysierten Gradienten als Sedimentationsmarker. In A sind die snRNAs rechts indiziert, in B sind links die Positionen von Molekulargewichtsmarkern (kDa) angegeben; auf dem Gel sind die U5-Proteine (fett, links) sowie die U1-Proteine identifiziert.

snRNPs kosedimentierten auch dann nicht signifikant, als die Salzkonzentration in der Gradientenlösung auf 100 mM KCl reduziert wurde (nicht gezeigt). Allerdings enthielten die Fraktionen bei 25S hier relativ mehr U1 und U5 snRNPs. Der mutmaßliche U1/U5-Komplex könnte unter den Bedingungen der Glyzeringradienten-Zentrifugation (Scherkräfte, Verdünnungseffekte) instabil sein.

Schließlich wurde die Salzkonzentration im Gradienten auf 50 mM KCl erniedrigt. Dies führte jedoch zur Aggregation der U1 snRNPs, die am Boden des Röhrchens sedimentierten. Das freie U5 snRNP hingegen sedimentierte nun in gänzlich reiner Form mit einem Maximum um 17S (Abb. 57 A): Die Proteinanalyse dieser Fraktionen zeigte Prp8p, Snu114p, Aar2p und die Sm Proteine als einzige Proteinkomponenten (SmB wurde hier allerdings nicht detektiert; Abb. 57 B).

Durch die Behandlung bei niedrigen Salzkonzentrationen ist es also möglich, das freie U5 snRNP in reiner Form zu erhalten. Dieser Komplex wurde dann auch elektronenmikroskopisch untersucht. Präparate des gereinigten U5 snRNPs aus dem Glyzeringradienten in Abb. 57 wurden für die Transmission-Elektronenmikroskopie hergestellt, wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben und anschließend in Zusammenarbeit mit Dr. B. Kastner untersucht.

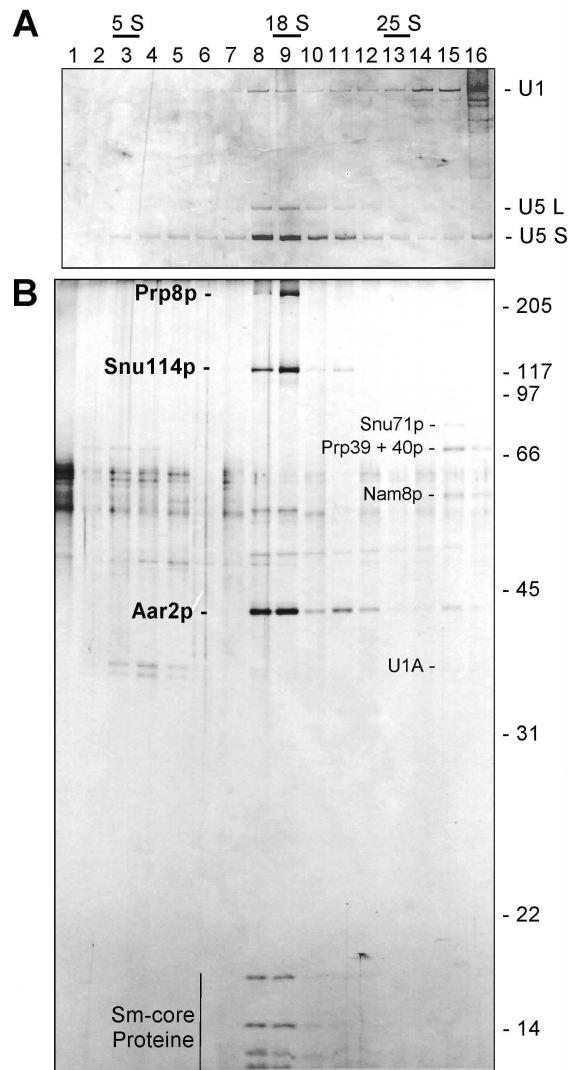


Abb. 57: Freie U5 snRNPs können durch Glyzeringradienten-Zentrifugation bei 50 mM KCl vollkommen von U1 snRNPs befreit werden

Analog zu Abb. 56. Die Zentrifugation wurde aber in einem kleineren Volumen (2,4 ml) im TLS-55 Rotor bei 55.000 U/min für 3,5 h ausgeführt. Die Salzkonzentration in der Gradientenlösung betrug nur 50 mM KCl. Es wurden 16 Fraktionen á 160 µl abgenommen. Die Analyse der RNAs und Proteine erfolgte wie in Abb. 56.

In Abb. 58 A sind repräsentative Ansichten des U5 snRNPs der Hefe gezeigt. Dieses besteht aus einer relativ einfachen, elongierten Domäne von etwa 10x25 nm. In einigen Ansichten sind auch noch kleinere, globuläre Strukturen zu erkennen, wie es auch beim tri-snRNP der Fall ist (Abb. 37 A). Diese elongierte Struktur könnte sich auch als Teil der tri-snRNP Struktur interpretieren lassen, etwa als dessen "rechte" Hälfte (in der Orientierung, wie sie in (Abb. 37 A) gezeigt ist. Dies würde mit der Positionierung des U5 snRNPs im menschlichen tri-snRNP übereinstimmen (siehe Einleitung,

Abb. 7). Der Vergleich mit dem menschlichen 20S U5 snRNP (Abb. 58 B) zeigt, daß sich die beiden Partikel, zumindest bei einer bestimmten Orientierung des menschlichen U5 snRNPs auf dem Kohlenfilm, recht ähnlich sehen. Andere Orientierungen des menschlichen U5 snRNPs zeigen dagegen noch zusätzlich viele kleine, globuläre Domänen, die aus der großen Hauptdomäne "herausschauen". Die Struktur des Hefe-U5 snRNPs erscheint im Vergleich "schlanker" zu sein. Im Einklang damit enthält das Hefe-U5 snRNP sechs Proteine weniger, als das menschliche U5 snRNP. Diese zusätzlichen Proteine im menschlichen Partikel (Proteine von 200, 110, 102, 100, 40 und 15 kDa) könnten für die zusätzliche Masse verantwortlich sein, die sich hier beobachten läßt. Aufgrund des vergleichsweise einfachen Aufbaus, ist das freie U5 snRNP der Hefe auch von Interesse für Untersuchungen seiner dreidimensionalen Struktur mit Hilfe der Kryoelektronenmikroskopie.

Das hier isolierte, freie U5 snRNP der Hefe ist ein sehr kompaktes snRNP, das nur drei spezifische Proteine enthält: Prp8p, Snu114p und Aar2p. Es sollte sich daher auch dazu eignen, durch RNA-Footprinting-Studien nähere Informationen über die Bindungsstellen von Snu114p und Prp8p auf der U5 snRNA zu erhalten. Nur diese beiden Proteine sind auch im

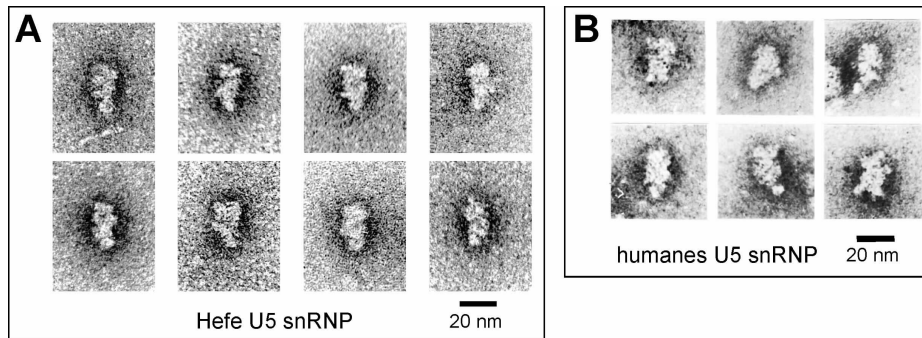


Abb. 58: Elektronenmikroskopischer Vergleich der freien U5 snRNPs in Hefe und Mensch

A: Repräsentative Ansichten des freien U5 snRNPs der Hefe, das durch Glyzeringradienten-Zentrifugation in Puffer mit 50 mM KCl von U1 snRNPs befreit wurde (vgl. Abb. 57). **B:** Verschiedene Ansichten des 20S U5 snRNPs des Menschen. Der Balken entspricht jeweils 20 nm.

[U4/U6.U5] tri-snRNP enthalten. Es ist nicht klar, ob in der Hefe noch weitere Arten von freien U5 snRNPs existieren, die z.B. dem humanen 20S U5 snRNP entsprechen könnten: Dieses enthält über die Orthologen von Prp8p und Snu114p hinaus noch sechs weitere tri-snRNP Proteine sowie ein U5 snRNP-spezifisches Protein (52 kDa). Ein U5 snRNP mit nahezu gleicher Zusammensetzung läßt sich beim Menschen durch Dissoziation des isolierten tri-snRNPs durch höhere Salzkonzentrationen gewinnen. Daher sollte hier überprüft werden, ob sich durch ein analoges Vorgehen auch aus dem tri-snRNP der Hefe ein U5 snRNP gewinnen läßt, das weitere tri-snRNP Proteine enthält.

4.6.4 Glyzeringradienten-Zentrifugation des [U4/U6.U5] tri-snRNPs der Hefe bei erhöhten Salzkonzentrationen (400 mM KCl)

Der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Komplex ist nur bei moderaten Salzkonzentrationen (bis ca. 250 mM) stabil, was aus zahlreichen Untersuchungen an tri-snRNP-assoziierten Proteinen deutlich wurde. Immunpräzipitationsstudien zeigten, daß die tri-snRNP-Proteine bei Salzkonzentrationen zwischen 200 und 400 mM Salz entweder völlig von den snRNPs abdissoziierten (Prp18p, Prp38p, Brr2p/Snu246p; siehe [63, 96, 98]), oder nur noch entweder mit dem U5 snRNP (Prp8p, Snu114p; siehe [38, 90]) oder dem U4/U6 snRNP (Prp31p, Prp3p, Prp4p, Prp6p; siehe [86, 91, 101, 102]) assoziiert blieben. Dies deutet auf eine Dissoziation des tri-snRNPs in seine Untereinheiten hin. Die hier untersuchten neuen tri-snRNP Proteine sind ebenfalls nur sehr schwach mit dem tri-snRNP assoziiert (bei 150-300 mM NaCl; siehe Abb. 38) und bleiben bei höheren Salzkonzentrationen weder mit dem U5 noch dem U4/U6 snRNP assoziiert. Hier sollte nun das Assoziationsverhalten aller tri-snRNP-Proteine sowie die Dissoziation des tri-snRNPs in U5 und U4/U6 snRNPs durch Glyzeringradienten-Zentrifugation des isolierten tri-snRNPs bei 400 mM Salz untersucht

werden. In Abb. 59 ist das Sedimentationsprofil der Proteine (A) und das der snRNAs (B) gezeigt.

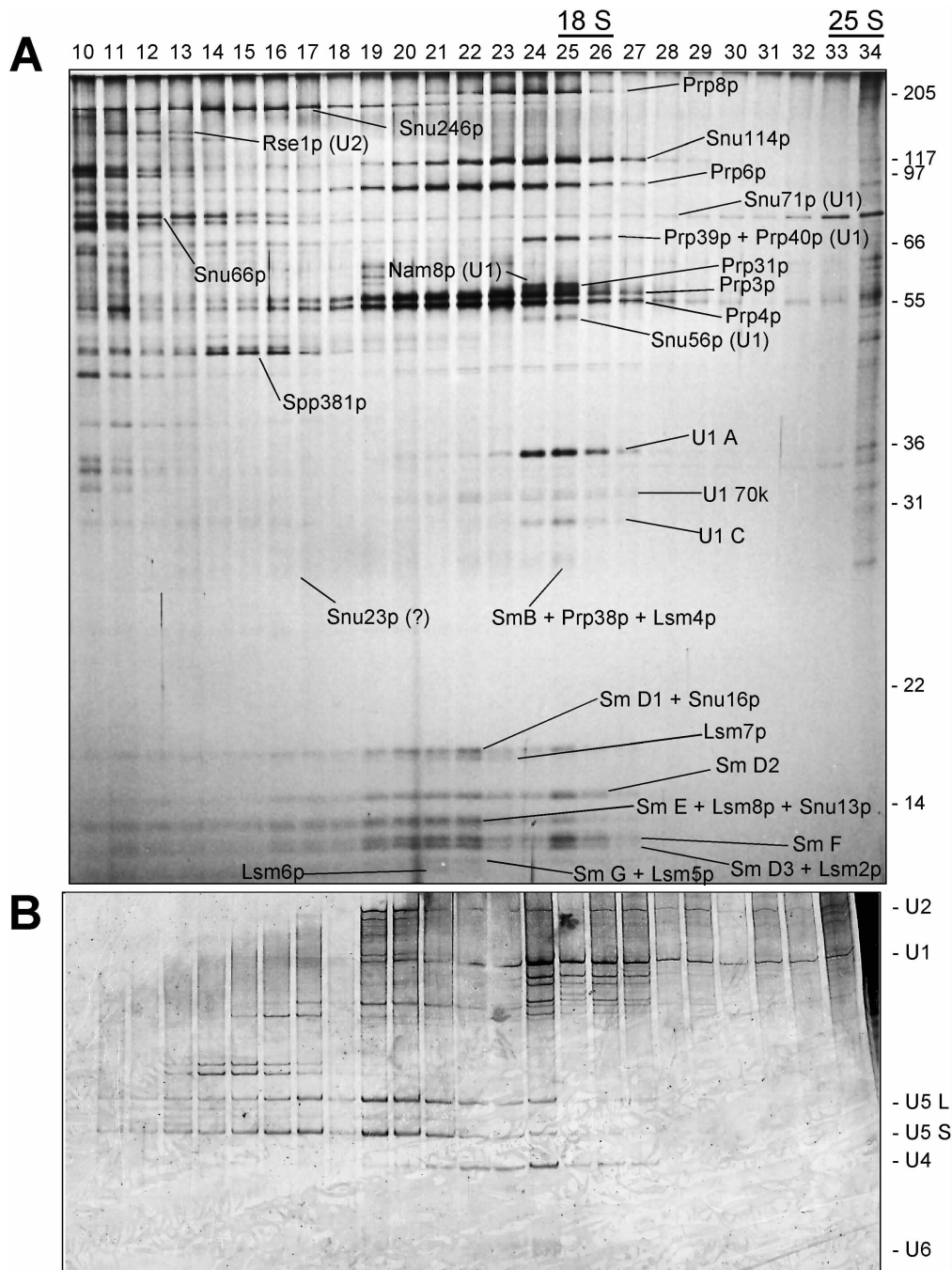


Abb. 59: Das [U4/U6.U5] tri-snRNP zerfällt in Gegenwart von 400 mM KCl in die U4/U6- und U5-Untereinheiten

Das Ni-NTA Eluat einer tri-snRNP Präparation wurde durch Zentrifugation auf einem 10-30% Glyzeringradienten mit 400 mM KCl für 20 h bei 38.500 U/min im Rotor SW-40 sedimentiert. Der Gradient wurde anschließend von oben her in 34 Aliquots von 330 µl fraktioniert, diese wurden extrahiert und Proteine (A) und RNAs (B) wurden separat durch denaturierende Harnstoff- bzw. SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Als Sedimentationsmarker diente in einem parallel gefahrenen Gradienten Gesamt-RNA aus Hefe, die Sedimentationspositionen der 18S und 25S rRNAs sind über den Fraktionen angegeben. Rechts sind in A die Positionen von Molekulargewichtsmarkern, in B sind die Identitäten der snRNAs angegeben. Die tri-snRNP-, U1- und U2-Proteine sind markiert, die Zuordnung der Banden erfolgte nach ihren apparenten Molekulargewichten.

Im Vergleich zur Sedimentation des tri-snRNPs bei 200 mM Salz (siehe Abb. 29) sind hier dramatische Unterschiede festzustellen. Das 25S [U4/U6.U5] tri-snRNP ist vollständig in seine Untereinheiten, also freie U5 und U4/U6 snRNPs dissoziiert. Keine der snRNAs ist in den Fraktionen um 25S detektierbar (Abb. 59 B; Fraktionen 32-34). Stattdessen sedimentiert die U5 snRNA weit verteilt in den Fraktionen 15-26, wobei Maxima in den Fraktionen 19-20 (ca. 12 S) und, in vergleichsweise geringerer Menge, um Fraktion 24 (17S) liegen. Die U4/U6 snRNAs finden sich ausschließlich in den Fraktionen 21-27 mit einem Maximum in den Fraktionen 23-24 (17 S). Bei dem Hauptmaximum von U5 snRNP in den 12S-Fraktionen handelt es sich vermutlich um core-U5 snRNPs, die nur die U5 snRNA und die Sm core Proteine enthalten. Dies wird durch die Proteinanalyse der Fraktionen bestätigt (Abb. 59 A): Zwar befindet sich hier zusätzlich zu den Sm Proteinen auch Brr2p/Snu246p, jedoch korrespondiert dessen Sedimentationsmaximum in Fraktion 15 nicht mit dem der U5 snRNA. Im Bereich des zweiten U5 snRNA-Maximums (Frak. 24), befindet sich auch das Maximum des U4/U6 snRNPs, dennoch sind die Sedimentationsmaxima dieser beiden Partikel leicht gegeneinander verschoben. Dies verdeutlicht eine Betrachtung der Kosedimentation der Proteine in diesen Fraktionen: Die U4/U6-assoziierten Proteine Prp31p, Prp3p, Prp4p und Prp6p kosedimentieren in den Fraktionen 19-26 mit einem Maximum bei Fraktion 23. Die U5 snRNP-spezifischen Proteine Prp8p und Snu114p aber, signifikanterweise, keine weiteren tri-snRNP Proteine, kosedimentieren dagegen in den Fraktionen 21-26, mit einem Maximum in Fraktion 24.

Die Sedimentation der restlichen Proteine (U1-, U2- und schwach assoziierte tri-snRNP-Proteine) soll hier nicht im Detail betrachtet werden, ist jedoch in Abb. 59 A indiziert. Es ist jedoch wichtig festzuhalten, daß dieses Experiment im Wesentlichen das bestätigt, was aus Immunpräzipitationsstudien mit den diversen tri-snRNP-Proteinen bekannt ist. Die Affinität der Proteine in der Hefe zu den jeweiligen snRNPs im tri-snRNP unterscheidet sich daher recht deutlich von der im menschlichen tri-snRNP. Ein zum humanen 20S U5 snRNP äquivalentes Partikel scheint in der Hefe nicht zu existieren, bzw. stabil zu sein. Das freie U5 snRNP der Hefe, wie es hier durch Salzbehandlung oder, wie zuvor beschrieben, durch biochemische Isolierung über das Aar2p Protein dargestellt werden kann, enthält nur Prp8p, Snu114p und die Sm Proteine und ist somit strukturell deutlich anders organisiert, als sein humanes Gegenstück (siehe auch Kapitel 4.6.3). Über Dib1p/Snu16p, dessen Orthologes mit dem humanen U5 snRNP assoziiert ist, kann hier keine Aussage getroffen werden, da es auf SDS-PAGE Gelen mit dem SmD1 Protein komigriert und keine Immunpräzipitationsexperimente mit spezifischen Antikörpern gegen Dib1p/Snu16p durchgeführt werden konnten.

Eine weitere wichtige Feststellung, die aus diesem letzten Experiment folgt, ist, daß das Aar2p Protein anscheinend nicht für die Stabilität des freien U5 snRNP Partikels notwendig ist. Das 18S U5 snRNP kann als intaktes Partikel aus dem [U4/U6.U5] tri-snRNP

gewonnen werden, der Aar2p nicht enthält. Da Aar2p in der Zelle nur als Bestandteil des freien U5 snRNPs, aber nicht des tri-snRNPs vorkommt, könnte es an der Bildung des tri-snRNPs aus seinen snRNP-Untereinheiten und den zusätzlichen Proteinen beteiligt sein, im Laufe dieser Zusammenlagerung aber vom U5 snRNP abdissoziieren. Alternativ könnte Aar2p, nachdem die Spleißreaktion beendet ist, an der Dissoziation des postspleißosomalen Komplexes (in U5, U2 und U6 snRNPs) beteiligt sein und so die Wiederverwertung des U5 bzw. tri-snRNPs unterstützen.

4.6.5 Zusammenfassung

Es wurde ein Protein identifiziert (Aar2p), das spezifisch nur mit dem freien U5 snRNP, jedoch nicht dem tri-snRNP assoziiert ist. Aar2p ist essentiell für vegetatives Zellwachstum, jedoch konnte nicht gezeigt werden, daß die Depletion von Aar2p zu einem Spleißdefekt führt. Das freie U5 snRNP konnte aus einem Stamm, der 10xHistidin-fusioniertes Aar2p exprimiert, präparativ isoliert werden. Dabei wurden äquimolare Mengen von U1 snRNPs koisoliert, was auf die Bildung eines stabilen Komplexes zwischen den beiden Partikeln hinweisen könnte. Durch Gradientenzentrifugation konnte dies jedoch nicht bestätigt werden, stattdessen gelang es aber, reine U5 snRNPs darzustellen. Dieses freie U5-Partikel enthält nur drei spezifische Proteine (Prp8p, Snu114p und Aar2p) und unterscheidet sich daher gravierend vom humanen 20S U5 snRNP, das mit insgesamt neun spezifischen Proteinen assoziiert ist (siehe Diskussion). Dieser Unterschied wird auch anhand der elektronenmikroskopischen Strukturen der beiden Partikel deutlich. Durch Dissoziation des Hefetri-snRNPs bei hohen Salzkonzentrationen konnte ebenfalls ein freies U5 snRNP dargestellt werden, das jedoch Aar2p nicht enthielt. Somit ist Aar2p nicht für die Stabilisierung des U5 snRNPs und seine Assoziation mit Prp8p, Snu114p und den Sm Proteinen verantwortlich.

4.7 Identifizierung und Charakterisierung neuer U2 snRNP-spezifischer Proteine

Das U2 snRNP war kein primäres Studienobjekt dieser Arbeit, d.h. es wurde nicht versucht, das U2 snRNP biochemisch zu reinigen. Bei der biochemischen Aufreinigung des [U4/U6.U5] tri-snRNPs wurden jedoch geringe Mengen an U2 snRNPs, vermutlich als Teil des [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNPs koisoliert, so daß in den gereinigten Fraktionen auch U2 snRNP-Proteine identifiziert wurden: Rse1p, Hsh49p und Snu17p; siehe Kapitel 4.4.2. Weitere bekannte U2 snRNP-Proteine, wie z.B. Lea1p oder Yib9p, wurden nicht identifiziert, könnten aber durchaus in dem tri-snRNP-haltigen Isolat enthalten gewesen sein. Hsh49p war bereits bekannt und ist das Hefe-Ortholog des humanen Proteins SAP49, welches als Untereinheit des tetrameren Protein-Komplexes SF3b mit dem humanen 18S U2 snRNP assoziiert ist. Snu17p ist ein neues U2 snRNP-Protein, Rse1p wurde gleichzeitig mit dieser Arbeit auch von anderen Gruppen identifiziert [175, 182]. Diese beiden Proteine wurden im Folgenden näher untersucht.

4.7.1 Analyse der Sequenzen von Rse1p und Snu17p

Rse1p ist ein Protein von 153,8 kDa und 1361 Aminosäuren. Chen und Mitarbeiter [175] identifizierten dieses Protein in einem genetischen Screen für Mutationen, die den Transport von Proteinen aus dem ER in den Golgi-Apparat unterbinden. Nähere Untersuchungen ergaben, daß die Mutation in Rse1p zu einer Spleißinhibition führt, welche auch die prä-mRNA des an diesem Transportprozeß direkt beteiligten Sar1p Proteins betrifft. Es kommt also durch den Spleißdefekt in der *rse1*-Mutante zu einer Depletion von Sar1p und somit indirekt zur Inhibition des ER-Golgi-Transportes. Die genaue Funktion von Rse1p im Spleißen sowie seine Assoziation mit snRNPs wurden jedoch nicht untersucht. Die Proteinsequenz von Rse1p (Abb. 60) ergibt keinen Hinweis auf eine spezifische Funktion des Proteins, jedoch ist Rse1p evolutionär stark konserviert. Es finden sich Homologe in vielen Organismen, die sich in drei Gruppen einteilen lassen. Die erste Gruppe enthält die Orthologen der humanen SF3b-Untereinheit SAP130 (R.Reed, persönliche Mitteilung) und hat die größere Ähnlichkeit zu Rse1p. Rse1p ist daher vermutlich das Hefe-Ortholog von SAP130. Darüberhinaus besitzt Rse1p Ähnlichkeit mit einem an der Polyadenylierung von mRNAs beteiligten Protein, der 160 kDa Untereinheit des cleavage and polyadenylation specificity factors, CPSF, und mit einer Gruppe von DNA-bindenden Proteinen, die an der Reparatur von UV-geschädigter DNA beteiligt sind (UV-DDB).

Rse1p	WGGGMMVSVLSPTAKMRKLEQASTTMAVDLKKREAEERIT-RSDHNIIMVAKDDLYLVHHTKKKQINNVH--SCICHVVDLEAGSRKRCSCQVATETHLELY--ITADGELKLLA	115
SAP130	TVE-VGVIRSLMAFR--TGG-TKD--YIVGSDSG--RIVLEWQPSKMPKELHETFCCKSGGRIVE--GOFLAVDPKGRAMVMSAIBKOKIVYILNRADARITISSP--LE	54
CPSF160	YAVYVQHPPPGLEFSMYCNFNNSERNIVVAITSQLYVYLRDAEALIKNDRSTGKAHREKELASFSFGNVMASVQLAGARR-DALLSFKDAKESVVEYDPPSHLKTLS	119
Rse1p	KFQNLKATIKSMKSLIPSSSRKASNWPTFLALHSDSGNLSIVQIMHAGALRKTELVNQPIRTRITRRVSE--TSYMEIDDPNGRCITISVVBONKICFLV--DYAOKIRISSP--LE	229
SAP130	TVE-VGVIRSLMAFR--TGG-TKD--YIVGSDSG--RIVLEWQPSKMPKELHETFCCKSGGRIVE--GOFLAVDPKGRAMVMSAIBKOKIVYILNRADARITISSP--LE	159
CPSF160	LHYFEEPELRDGFVQVNR--PRVRVLPDG--RCAMLVYCTRIIVLPERRER--AEEBEGLVGEGQRSSFLSYITDVRALLKLLNLQDLQFHGYEPT--LILFENQIMGRV	231
Rse1p	IRPHMVTLDMAVVDNPN--G-VILSH--AATQLSVHIFVYVLSGLNHHVKKADYLVNPSANFVLSLIDLRYNITTSLSDNNYDADYDIFNFPVVIIGFBNH	334
SAP130	AHKANILVYHVVDNPFN--M--MACLEMYEEADNDPTGAPANTQQTIFPVEGLD--LNHHVKKVSEPEEHEGNLITVGGG--DG--PSG--VLCSENY	255
CPSF160	AVRQDICSIVALSINITQKVHVIWVSLTSPPF--CTQALA--VPKPIGGVVFVANSILYNOSVPPYGVANSLTTGTATFALRT-----QEGVRIITDCAQATFISYDK	334
Rse1p	ILVDMNPFSSLKVEIP--KST--TNSRHNVTIISGIVQKNDFFVLOSNEGDFKLTVSPDITNRNRLVQSYFDITONSHOLHIFRN--GLFLALSBMMNNEFLDEKRLG--VVK	448
SAP130	ITYNFDOPDIRCP--RRNDLDDPERGMIRVCSATHKIKSMPEFLACTEQVIFKIDETD--BO-MVTEIRKYFDVBPVAAAMVLTG--CEFLVASSFGNHYLMOTAHLCDDDE	370
CPSF160	MVLSLKGCEIYVLTITDGMSSVRAFHFPAASVLTSMVMEPGYLPFCRLSNLSLKYTEKLQEPASAVREAADKEEPKSKKRWDAAAGSAAKGSVPQDEVDLIVYSSAQS	454
Rse1p	NDFSNVLTSDPNKSPVSES--TK--ONISLISQOLNLPSTKSOVS--DSF--LSIAHFTNNKTIITNAVSNLSIST-----SDPPMATKIILIPPEATIGDNN-----TL	549
SAP130	PEFSAMPLDGD--TFFV--RPLKNIIVLVDLSDLSPLIFCQADLANE--DIPOLIVACGGRSSRLVRHGLEVSEMAVS--EPPSNNAVITVRRHIED--PFF--AY	473
CPSF160	GTQLATYSPVVCISINICCANAAEGEPAP--SEFQNSPEPDLEIVCSCGGKNGALSVLQ--SIRQVVFELPGCDMWTIAPVRKSEEDNKGEGEQEESTTPEALDDGRRHGE	574
Rse1p	PFTPKKIMLOIDNBSMEPLDEEATPSAKLSQDTIHTH--LMGSHSTVOVCTAEALRHIVPTKSRYSKLTVPFASTRIV--CATSSKTQITISVNYELVYKTIIVSSDS----	662
SAP130	TIIVSFVNAIVLSIC--ETVEVVI--SGPLGT--PTILSCSLICDDALVOVYVPGIRHIR--ADKRV--EMKTEGKKTIVKCAVNOR--OVVIAARGGELYVEMDPSEQ----	573
CPSF160	ILSREDSIMLOIC--SMTMELD--SGPATQG--PIVPAGNIGDNRVIVOVSELSIRLLE--GVNQLHF--IPVDLCAPIVQCAVADP--YVVMISAE--HVTMELIKSPSYGGRHHR	681
Rse1p	-----DIELTHP--DTMPSKVAIVQIT--CHADILALADNEGMIKIMSK--OKEDS--LTVISILVSEKISDMIMV--RD-----SSIGQNDHV	743
SAP130	-----INBYERRKMS--ADVCMISLANVPPGE--ORSRKIVVDNVIPTSDPP--SCLOQPSQALPACPSLCLIVEMGGTEKODE--LGRGSGICFVYDNI	667
CPSF160	LALHKPPLHHSQKVI--CLYRDLDSGMFTESRLGGAR--ELGGRGGEPAG--GSE--SPTVDDHEEMLYGSGSLSP--SKKEARRS--QPPARDPAPF--RASP--PTHWCLLVRENTIMEIYLPD	801
Rse1p	-----LQNC--VYMKFHIQVDS--FIDIKRR--ELGLK--VDSYAREIS--VS--NNEE--BEEED-----DDDEKEEEETIS-----SGA--MSC-----	818
SAP130	-----LQNC--VLLRIVTVEPES--LSDPTTR--LQSRG--VILFRVMOQ--EAMVAMSSRW--VS--YQSFHLTDSY-----ETLFPASC-----	744
CPSF160	WRLVFLVRNFFVGGVVLVSSFGOPT--QGEAREEATRCGLP--VKEVLVALSRQSRPYLVHVDQIL--YAFPHDSQLGQGNLKVREKVE--HINFRKKPKPKK--SGGAEG	921
Rse1p	-----VUCHSSSTVSYVWVWVH--ROKQDNMLSCSKCNADVAINGVCSISS--SER--GRVSNFPTL--NWFH--HESSV-----NK--ENGSGD--SNEB	908
SAP130	-----BASEQCPEGIVAIST--LIRDALEKLCVFNQWAPLOYTPRVIH--PESNLLIET--DHNMYTEATQ--K--K--MAEMV--PAGED	830
CPSF160	AGARGVAVFRFYFEDYIGYSGV--CGPS--HMLVY--G--ADR--HPMAID--VDS--AP--HNVNCR--GELYFNRC--E--R--SVLPALVSYDAP--P--P--R--CTAHYVAYHVS--K--V--VATS	1039
Rse1p	DEMEBEMQISTFR--TILSP--NNE--KSLIF--DSHGKQCRIS--LQDGECLK--GSSDHLKILDDIT--CVSAAITDF--ROAD--HLIT--GACDKRL--LTKIL--NK--K--SD	1018
SAP130	DEMEBEMQISTFR--TILSP--NNE--KSLIF--DSHGKQCRIS--LQDGECLK--GSSDHLKILDDIT--CVSAAITDF--ROAD--HLIT--GACDKRL--LTKIL--NK--K--SD	939
CPSF160	TNTPCARIPRMTGEEKFETTERDERYTHQOEAFS--QLISEVSWAIPNARIP--QEW--HVTCKMTVSLRSEETV--SGLKGYVAG--CLMQGEEV--R--GRIL--MDVIEV--PEP--Q--LTKNK	1159
Rse1p	IELLHTEIIS--THAMLR--KNFL--TAMSTV--VYGLGK--KOLLRSV--TQTPVS--ITKIVSMH--WNYER--LAVG--HESV--FINDPAGNVF--PYVDS--SVKR--HVT--VLR--LDAV--V--ADRY	1135
SAP130	-----LHRTVEVPPAALAP--Q--RMVIGV--KLLRV--DLGK--KLLRCENK--H--ANYIS--SIG--TIGHRV--LSDV--CESF--IIVRY--KRNEN--LIFADDY--PRMVT--IASL--YD--VAG--HEHDE	1049
CPSF160	FKVLYEKE--QK--E--V--L--CHCN--H--V--S--L--C--K--F--L--NS--RASE--L--TGM--FID--TQLY--HOMIS--VKNFL--AADV--MS--IS--L--RY--QESK--L--SVSR--AK--LE--Y--SV--D--V--MDN--AQ--L--FLV--SRD	1275
Rse1p	GNAWT--RSPP--CEKIMSN--DPS--ELSG--ALGK--YPL--VIT--LOOK--PNTYDC--KFK--Q--LLN--EFF--NDI--ITDP--HILDS--LNS--DR--PGC--V--MGL--G--T--V--G--C--F--L--S--K--GN--V--FM--GN--IEN--IMAE--ADT--V	1255
SAP130	GNICV--VRL--PNTNDEVD--EDPT--GNKAL--W--R--R--L--NGASO--AEVIMNY--V--GTLS--L--ORT--L--IP--G--S--E--L--V--Y--L--S--G--G--I--L--V--E--F--S--HEHDE	1141
CPSF160	RNLVWYMLP--PAKESFG--SMRL--BRADFHYGARHNTFWRT--CRATEG--SK--SVVWENKHITWF--P--GGIG--L--L--MQE--K--TYRRL	1358
Rse1p	LDYSRKKNNM--KEDDEE--SGSVVLQGR--H--SIEDEI--ICEGS--SILGRDE--O--EY--RSY--V--V--R--K--VIDG--DL--C--N--F--L--S--L--NE--C--F--L--N--K--S--V--Q--V--E--D--I--Q--T--I--N--E--V--R--T--N--M	1361
SAP130	OHVE--MEIR--S--H--P--L--GRDEL--SR--SY--P--V--V--N--IDG--DL--C--N--S--M--E--P--K--K--N--V--S--E--L--D--R--T--P--E--V--S--K--L--E--D--I--R--T--H--F--	1217
CPSF160	MLQ--NALT--MLP--H--AG--L--N--RAF--RML--V--D--R--L--Q--N--A--V--N--V--D--G--L--N--R--V--S--T--M--R--S--E--L--K--K--I--G--T--F--D--I--L--D--L--D--T--R--V--T--A--H--	1442

Abb. 60: Sequenzvergleich von Rse1p mit den humanen SAP130 sowie CPSF160

Rse1p ist das Hefeortholog der humanen SF3b Untereinheit SAP130 (R.Reed, persönliche Mitteilung). Darüberhinaus besitzt es signifikante Homologie zu einem menschlichen Protein, welches an der Polyadenylierung beteiligt ist, der 160 kDa Untereinheit des cleavage and polyadenylation specificity factors, CPSF. Rse1p und SAP130 sind zu 24 % identisch (schwarz unterlegte Aminosäuren) und zu 38 % ähnlich (grau unterlegt). Beide Proteine besitzen 23 bzw. 24 % Homologie zu CPSF160. Die Sequenzen der massenspektrometrisch identifizierten Peptide in Rse1p sind fett gedruckt, unterstrichen und über der Sequenz durch einen Strich markiert.

Snu17p ist ein 17,1 kDa Protein mit 148 Aminosäuren. Dieses Protein enthält eine zentrale RNA-Bindungsdomäne vom RRM Typ mit den beiden charakteristischen Sequenzmotiven RNP-2 (Positionen 33-38) und RNP-1 (Pos. 72-79). Eine Datenbanksuche nach homologen menschlichen Proteinen ergab mehrere, zum Teil hochkonservierte Kandida-

Snu17p	MNKLQQIND--KELOSGLLSPHQSWHNEYKDNAMITYICNLNRELTEGDILTTFVSEYGVVDVILSRDENTGES	71
H.sap.	TKVKLLINDLNEREVQLGVADK-VSWHSEYKDSAWIFLGLPYELTEGDILCVFSQYGEIVNINIVRDKKTKGS	72
Snu17p	QGFAYLKVEDQSTILAVDNLNGEKIGGRALKIDHT-FYRPKRSLOKYYEAVKEELDRDIVSKNNAEKLILAKKDQ-PN	148
H.sap.	KGCFLCYEDQSTILAVDNFNGIKIKERTIRVDHVSNYRAPKDSIIDVTTRQLQEKGCARTPSPSESSEDEKPP	150

Abb. 61: Sequenzalignment von Snu17p mit einem EST-abgeleiteten Humanhomolog

Die Sequenz von Snu17p wurde mit der EST-abgeleiteten Sequenz eines humanen Proteins verglichen (Accession Nummer AF685815). Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau unterlegt. Die beiden Sequenzen sind zu 41 % identisch, die Homologie beträgt 55 %. Die RNA-Bindungsdomäne ist unter der Sequenz mit einem gestrichelten Pfeil markiert, die Sequenzmotive RNP-2 und RNP-1 (Pos. 33-38 und 72-79 in Snu17p) sind mit Pfeilen über der Sequenz bezeichnet. Die Sequenzen der massenspektrometrisch identifizierten Peptide von Snu17p sind fett und unterstrichen gedruckt.

ten. Eine aus einer EST-Sequenz abgeleitete Proteinsequenz zeigt eine besonders große Ähnlichkeit zu Snu17p und ist in Abb. 61 im Sequenzvergleich mit Snu17p gezeigt. Dieses Protein könnte daher das menschliche Orthologe von Snu17p sein.

Zunächst wurden Rse1p und Snu17p, wie in Kapitel 4.4.5 beschrieben, *in vivo* C-terminal mit einem Protein A Tag fusioniert und die resultierenden Extrakte wurden für Immunpräzipitationsexperimente eingesetzt, um die Assoziation der beiden Proteine mit snRNPs zu analysieren.

4.7.2 Rse1p und Snu17p sind spezifisch mit dem U2 snRNP assoziiert

Die Immunpräzipitationsexperimente wurden wie in Kapitel 4.4.6 beschrieben durchgeführt. Die RNA-Analyse der kopräzipitierten snRNPs ist in Abb. 62 gezeigt.

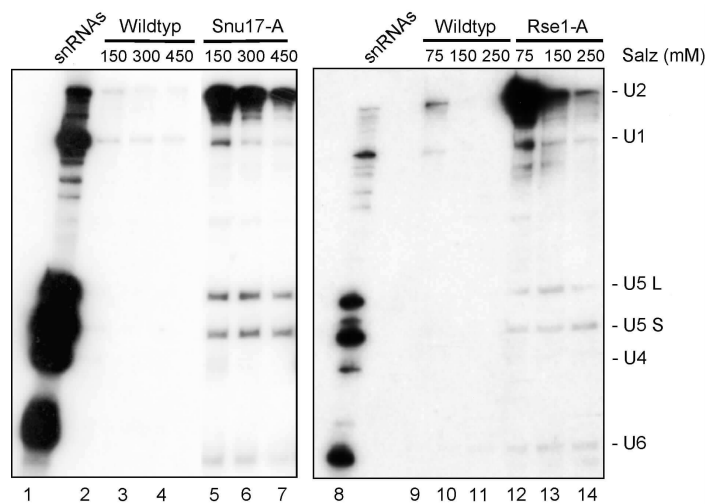


Abb. 62: Das U2 snRNP wird spezifisch mit Rse1-protAp und Snu17-protAp kopräzipitiert

Immunpräzipitationsexperimente und Northern Blot-Analysen wurden wie in Abb. 38 beschrieben durchgeführt. Für Rse1p wurde die Präzipitation in NET-2 Puffer mit 75 mM NaCl durchgeführt, die Präzipitate wurden dann mit Puffer von 75, 150 und 250 mM NaCl (Spuren 12-14) gewaschen. Bei Snu17p wurden entsprechend 150, 300 und 450 mM NaCl verwendet (Spuren 5-7). Die entsprechenden Präzipitationen aus Wildtyp-Extrakt, der kein ProtA-fusio-niertes Protein enthielt, sind in den Spuren 2-4 und 9-11 gezeigt, in den Spuren 1 und 8 sind jeweils snRNAs aufgetragen, die aus dem isolierten tri-snRNP gewonnen

wurden. Beide Proteine präzipitierten außer dem U2 snRNP auch geringe Mengen an U5, U4 und U6 snRNPs. Das Signal der U4 snRNA in der Rse1p-Präzipitation ist nur undeutlich zu erkennen, da eine schwache Sonde verwendet wurde.

Rse1p ist bei 75 mM Salz signifikant mit dem U2 snRNP assoziiert (Abb. 62, Spur 12), jedoch wurden schon bei 150 mM Salz nur noch kleine Mengen an U2 snRNP mit Rse1p kopräzipitiert (Spur 13). Diese Menge wurde durch höhere Salzkonzentrationen (250 mM, Spur 14) noch weiter reduziert (nicht gezeigt). Außer U2 wurden bei allen getesteten Salzkonzentrationen auch noch geringe Mengen an U5, U4 und U6 snRNPs, jedoch keine U1 snRNPs mit Rse1p kopräzipitiert.

Snu17p ist ebenfalls ein U2-spezifisches Protein (Abb. 62, Spuren 5-7), wobei es sehr viel stabiler als Rse1p mit dem U2 snRNP assoziiert ist: Selbst bei höheren Konzentrationen an NaCl (450 mM; Spur 7) wird die U2 snRNA noch deutlich präzipitiert. Auch mit Snu17p werden geringe Mengen von U5, U4 und U6 snRNAs, jedoch keine U1 snRNA kopräzipitiert.

Einige der in Kapitel 4.4 beschriebenen Experimente, die zur Charakterisierung der neuen tri-snRNP-Proteine dienten, wurden parallel auch mit Rse1p und Snu17p durchgeführt. Die Ergebnisse sollen hier daher nur kurz erläutert werden.

4.7.3 Rse1p und Snu17p assoziieren *in vitro* stabil mit dem Spleißosom

Um zu ermitteln, ob Rse1p und Snu17p *in vitro* mit dem Spleißosom assoziieren, wurde analysiert, ob mit diesen Proteinen radioaktiv markierte prä-mRNA und/oder Spleißprodukte aus einer Spleißreaktion kopräzipitiert werden können (Abb. 63).

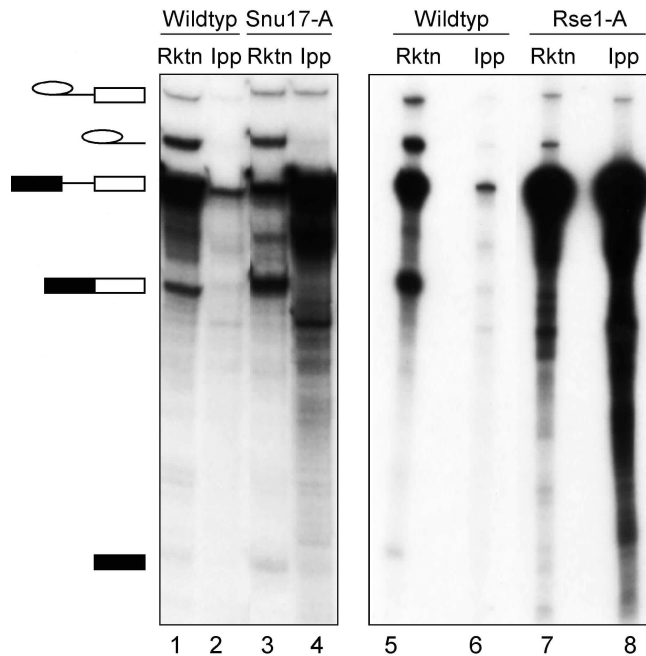


Abb. 63: Die prä-mRNA und das Intron-Exon2-Intermediat werden mit Rse1p und Snu17p aus Spleißreaktionen kopräzipitiert

In vitro Spleißreaktionen wurden, wie in Abb. 44 beschrieben, mit radioaktiv markierter Aktin prä-mRNA angesetzt. Es wurden ein Wildtyp-Extrakt, der kein protA-fusioniertes Protein enthielt (Spuren 1, 2, 5 und 6), sowie Snu17-protAp- (Spuren 3 und 4) und Rse1-protAp-haltige Extrakte verwendet (Spuren 7 und 8). Jeweils in den geradzahlig nummerierten Spuren sind die Produkte der Spleißreaktionen aufgetragen, in den ungeradzahlig nummerierten Spuren sind die RNAs aufgetragen, die aus den IgG-Agarose-Präzipitaten extrahiert wurden. Radioaktiv markierte RNAs wurden durch denaturierende Harnstoff-PAGE getrennt und autoradiographisch analysiert. Beschriftung wie in Abb. 44.

Diese Experimente führten für beide Proteine zu identischen Ergebnissen. Die prä-mRNA wurde mit beiden Proteinen spezifisch und in großen Mengen kopräzipitiert (Abb. 63; Spuren 4 und 8), und zwar wesentlich effizienter, als das bei den tri-snRNP-Proteinen Snu66p und Snu23p beobachtet wurde (vgl. mit Abb. 44). Diese Unterschiede sind vermutlich darauf zurückzuführen, daß Rse1p und Snu17p als Teil des U2 snRNPs auch Bestandteil des Prä-Spleißosoms (bestehend aus U1 und U2 snRNPs) sind, mit dem die prä-mRNA assoziiert ist, bevor das [U4/U6.U5] tri-snRNP (und somit Snu66p und Snu23p) rekrutiert wird. Da U1 und U2 snRNPs in der Zelle in 5 - 10 mal höheren Mengen als tri-snRNPs vorhanden sind, wird in einer Spleißreaktion auch viel mehr prä-mRNA mit dem Prä-Spleißosom als mit dem Spleißosom assoziiert sein.

Im Einklang mit dieser Annahme wurden geringe, aber signifikante Mengen des Intron-Exon2-Intermediates mit Rse1p und Snu17p kopräzipitiert (Abb. 63; Spuren 4 und 8). Dies deutet an, daß beide Proteine auch mit dem aktiven Spleißosom assoziiert sind, was man von U2 snRNP-Proteinen erwarten würde. Es ist jedoch unerwartet, daß diese beiden Proteine offenbar nach Vollendung des zweiten katalytischen Schrittes keinen Kontakt mehr zum gespleißten Intron haben (das Intron-Lariat wurde nicht kopräzipitiert; siehe Diskussion).

Die direkte Assoziation von Rse1p mit aktivierten Spleißosomen wurde auch durch Affinitätsreinigung von Spleißosomen auf biotinylierter prä-mRNA gezeigt. Dieses Experi-

ment wurde parallel mit dem in Abb. 45 gezeigten durchgeführt und erbrachte ein zu Snu66p und Snu23p identisches Ergebnis. Im Streptavidin-Agarose Präzipitat waren U2, U1, U5 und U6 snRNAs sowie das Rse1p Protein selbst enthalten, jedoch nicht die U4 snRNA (nicht gezeigt, siehe [128]). Dies bestätigt, daß Rse1p Bestandteil des aktivierten Spleißosoms ist.

4.7.4 Snu17p bindet während der Spleißreaktion *in vitro* direkt an die prä-mRNA

Snu17p enthält eine RNA-Bindungsdomäne und ist während der Spleißreaktion als Teil des U2 snRNPs mit der prä-mRNA assoziiert (siehe Abb. 63). Daher lag es nahe zu untersuchen, ob Snu17p die prä-mRNA direkt kontaktiert. Diese Möglichkeit wurde durch UV-Quervernetzung überprüft. Der Snu17-protAp Extrakt wurde unter Spleißbedingungen mit ³²P-markierter Aktin prä-mRNA hoher spezifischer Aktivität inkubiert, die Reaktion wurde auf Eis gestoppt, und die Reaktionsmischung mit UV-Licht von 254 nm Wellenlänge bestrahlt, um die radioaktiv markierte prä-mRNA kovalent mit spleißosomalen Proteinen zu vernetzen. Die Reaktionsmischung wurde dann mit RNase T1 inkubiert, welche die RNA am 3'-Phosphat von Guanosinresten spaltet. Dadurch verbleibt nur ein kurzes Stück der markierten RNA mit dem Protein vernetzt, so daß dieses durch SDS-PAGE analysiert werden kann, ohne daß die elektrophoretische Mobilität des Proteins zu sehr verändert wird. Snu17-protAp und daran eventuell vernetzte RNA-Oligonukleotide wurden aus der Mischung mit IgG-Agarose präzipitiert, das Präzipitat wurde ohne Extraktion in SDS-Probenpuffer gelöst, und nach elektrophoretischer Trennung auf wurde das Gel durch Autoradiographie auf radioaktiv markierte Proteinbanden hin analysiert. Als Negativkontrolle wurde parallel eine Spleißreaktion mit Wildtyp-Extrakt, der kein protA-fusioniertes Protein enthält, angesetzt. Desweiteren wurden die Reaktionsansätze geteilt und nur die eine Hälfte wurde mit UV-Licht bestrahlt, so daß man zwischen kovalent vernetzter RNA und unspezifisch kopräzipitierten RNA-Oligonukleotiden unterscheiden kann (Abb. 64).

Nach Autoradiographie des Gels ließ sich eine spezifisch kopräzipitierte, mit radioaktiv markierter RNA kovalent vernetzte Proteinbande von ca. 40 kDa identifizieren (Abb. 64, Spur 4). Da Snu17-protAp selbst auf solchen Gelen als 32 kDa Protein migriert, ist es sehr wahrscheinlich, daß diese Bande Snu17-protAp repräsentiert, welches durch ein kovalent verknüpftes RNA-Oligonukleotid eine Gelretardation erfahren hat. Diese Bande war spezifisch, da sie weder in der Kontrolle mit Wildtypextrakt, aus dem kein Snu17p präzipitiert wird (Spur 2), noch in den Kontrollen ohne UV-Quervernetzung (Spuren 1 und 3) detektiert wurde. Snu17p hat also während der Spleißreaktion einen engen Kontakt zur prä-mRNA, der höchstwahrscheinlich auf eine direkte Protein/RNA-Wechselwirkung durch die RBD in Snu17p zurückzuführen ist.

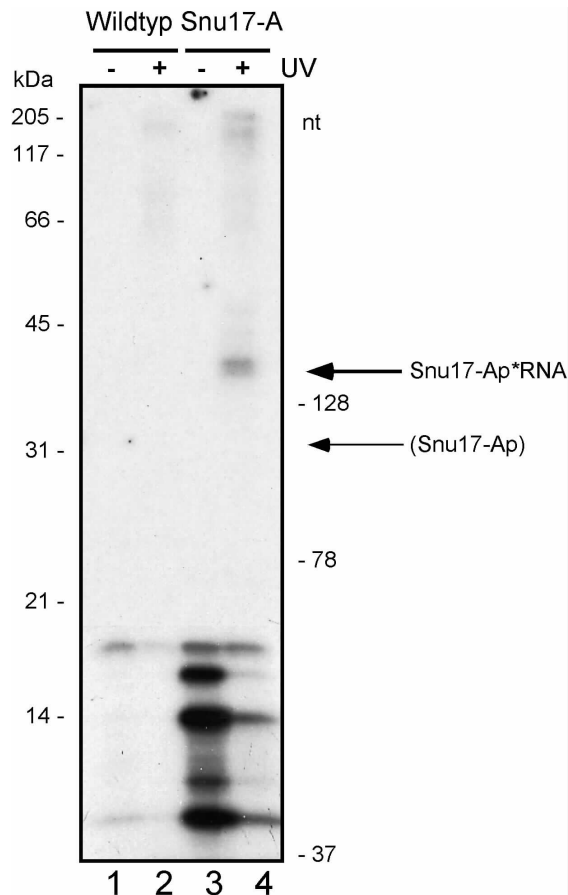


Abb. 64: Snu17p wird durch UV-Licht im (Prä-) Spleißosom mit der prä-mRNA quervernetzt

Wildtyp-Extrakt (Spuren 1 und 2) oder Snu17-protAp-haltiger Extrakt (Spuren 3 und 4) wurden *in vitro* mit radioaktiv markierter Aktin prä-mRNA unter Spleißbedingungen inkubiert und dann für 7 min. mit UV-Licht von 254 nm bestrahlt (Spuren 2 und 4). Die Reaktionsmischungen wurden dann mit RNase T1 bei 37°C für 35 min. inkubiert, anschließend wurde mit IgG-Agarose in Puffer NET-2 150 präzipitiert. Die Präzipitate wurden komplett in SDS-Probenpuffer aufgekocht, auf einem 13%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt, das Gel wurde getrocknet und damit ein Röntgenfilm exponiert. Links sind die Positionen von Protein-Molekulargewichtsmarkern (in kDa), rechts die Größen von RNA-Längenmarkern indiziert (in Nukleotiden). Außerdem sind rechts die erwartete Position von unmodifiziertem Snu17-protAp sowie die des mit RNA quervernetzten Snu17-protAp angegeben (Snu17-Ap*RNA).

Interessanterweise wurden auch einige kurze prä-mRNA-Oligonukleotide unterschiedlicher Länge (40 - 60 nt) mit Snu17p kopräzipitiert, die nicht mit dem Protein quervernetzt sind (Spur 3, -UV). Diese könnten, vor RNase T1 Verdau geschützt, an Proteine gebunden sein, die

mit Snu17p kopräzipitiert werden (z.B. weitere U2 snRNP-Proteine). Größere Proteinbanden, die mit prä-mRNA vernetzt sind (Spur 4, zwischen 60 und 200 kDa) rühren vermutlich von unspezifischer Kopräzipitation her, da diese auch in Spur 2 detektiert wurden.

4.7.5 Die Gen-Deletion von *SNU17* erzeugt einen temperatursensitiven Phänotyp

Die Tatsache, daß Snu17p ein U2 snRNP-Protein und Teil des Spleißosoms ist, sowie daß es direkt die prä-mRNA bindet, legt die Vermutung nahe, daß das Protein entscheidend am prä-mRNA Spleißen beteiligt ist. Es wurde daher überprüft, ob *SNU17* ein essentielles Gen ist. Durch homologe Rekombination wurde eine chromosomale Kopie von *SNU17* in einem diploiden Stamm mit einem Markergen zerstört (Stamm AGY17; vgl. Kapitel 4.3.5.3. und siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.5.1.2). Nach Sporulierung und Tetradenanalyse ließ sich kein letaler Phänotyp der Gen-Deletion erkennen. Ein haploider Stamm mit der *snu17Δ*-Mutation wurde isoliert (AGY21) und seine Wachstumsrate wurde, bei verschiedenen Temperaturen, untersucht und mit der eines haploiden Wildtypisolats des gleichen parental Stammes (TR2 a) verglichen (Abb. 65). Hierbei wurde deutlich, daß die *snu17*-Deletion einen Temperatur-sensitiven (*ts*⁻) Phänotyp erzeugt: Die Zellen wuchsen normal bei 22 und 30°C, zeigten jedoch einen deutlichen Wachstumsdefekt bei 37°C.

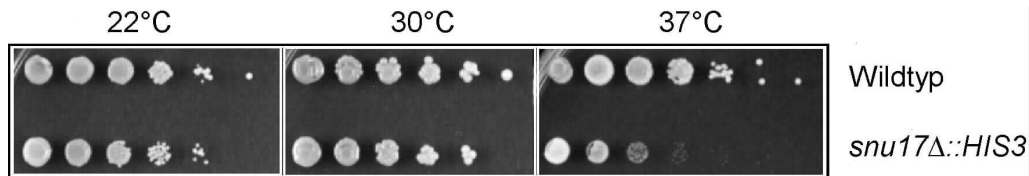


Abb. 65: Die *snu17Δ*-Mutation erzeugt einen Temperatur-sensitiven Wachstums-Phänotyp

Ein Allel von *SNU17* wurde in einem diploiden Stamm durch homologe Rekombination mit einem Markergen zerstört und ein haploider Stamm mit der *snu17Δ*-Mutation wurde isoliert (Stamm AGY21). Von einer Zellsuspension dieses Stammes wurde in einer Mikrotiterplatte eine Verdünnungsreihe (jeweils 1/10) hergestellt und die Zellen wurden mehrfach auf YPD-Platten übertragen. Zur Kontrolle wurde genauso mit Wildtyp-Zellen (Stamm TR2a) verfahren. Die Platten wurden für zwei Tage bei verschiedenen Temperaturen (22°C, 30°C und 37°C) inkubiert.

Snu17p scheint also keine essentielle Rolle im prä-mRNA Spleißen zu spielen, zumindest nicht bei moderaten Temperaturen. Die Funktion von Snu17p könnte zwar zur Effizienz der Spleißreaktion beitragen; andere Proteine könnten aber die Funktion von Snu17p zumindest in einem Maße übernehmen, das ausreichende Spleißaktivität und somit die Expression essentieller Spleißprodukte gewährleistet. Bei höheren Temperaturen scheint die Funktion von Snu17p essentiell zu sein. Formell kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß Snu17p überhaupt keine Funktion im Spleißen hat, und daß der Phänotyp der *snu17Δ*-Mutation mit einer anderen zellulären Funktion von Snu17p zusammenhängt. Um dies zu überprüfen, wurde die Spleißaktivität des *snu17Δ*-Extraktes *in vitro* untersucht.

4.7.6 Die Spleißaktivität im *snu17Δ* Extrakt ist stark beeinträchtigt, temperaturabhängig und wird durch Zugabe von rekombinantem GST-Snu17p rekonstituiert

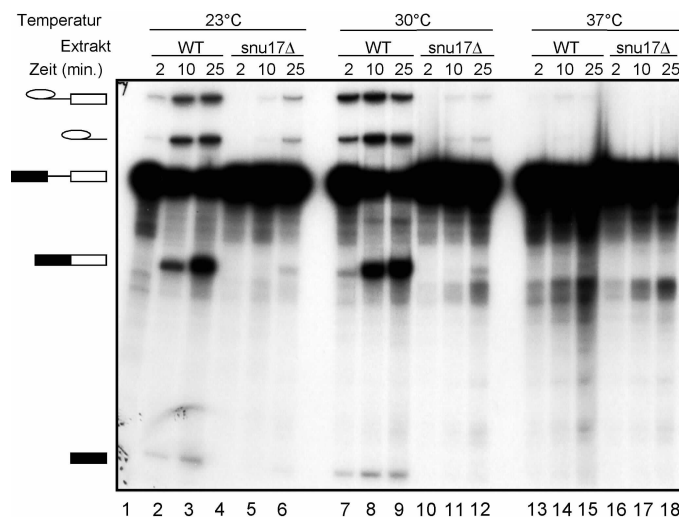


Abb. 66: Die *snu17Δ*-Mutation führt *in vitro* zu einer temperaturabhängigen Spleißinhibition

Spleißextrakte aus dem Wildtyp- (Spuren 1-3, 7-9 und 13-15) und dem *snu17Δ*-Stamm (AGY21; Spuren 4-6, 10-12 und 16-18) wurden mit radioaktiv markierter Aktin prä-mRNA bei 23°C (Spuren 1-6), 30°C (Spuren 7-12) oder 37°C (Spuren 13-18) inkubiert. Aliquote der Reaktionmischungen wurden nach 2, 10 oder 25 min abgenommen (wie über den Spuren indiziert), die Spleißprodukte wurden nach Proteinase K-Behandlung extrahiert und durch denaturierende Harnstoff-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Identität der radioaktiven RNAs ist links schematisch indiziert.

Um die Funktion von Snu17p im prä-mRNA Spleißen besser verstehen zu können, wurde die Spleißaktivität im *snu17Δ*-Extrakt *in vitro* in Abhängigkeit von der Temperatur analysiert. Spleißextrakte wurden aus dem *snu17Δ*-Stamm (AGY21) sowie - als Kontrolle -

aus dem haploiden Wildtyp-Stamm (TR2a) hergestellt. Spleißansätze mit radioaktiv markierter Aktin prä-mRNA wurden bei verschiedenen Temperaturen inkubiert, Aliquote der Reaktionen wurden nach jeweils 2, 10 und 25 min abgenommen und die Bildung der Spleißprodukte wurde wie üblich analysiert (Abb. 66). Dieses Experiment zeigte, daß die Spleißaktivität im *snu17Δ*-Extrakt schon bei 23°C deutlich schlechter als die des Wildtyp-Extraktes ist, jedoch nicht völlig unterbunden wird (vgl. Spuren 4-6 mit 1-3). Bei 30°C ist die Aktivität des Wildtyp-Extraktes gleich gut wie bei 23°C (Spuren 7-9), während die des *snu17Δ*-Extraktes noch schwächer ist, als bei 23°C (Spuren 10-12). Bei 37°C ist die Spleißaktivität auch im Wildtyp-Extrakt stark beeinträchtigt (Spuren 13-15), im *snu17Δ*-Extrakt ist jedoch gar keine Aktivität mehr detektierbar (Spuren 16-18). Snu17p muß an spleißosomalen Vorgängen vor oder während des ersten katalytischen Schrittes beteiligt ist, da bereits dieser Schritt durch die Abwesenheit von Snu17p inhibiert ist.

Schließlich wurde überprüft, ob durch Zugabe von rekombinantem GST-Snu17p die Spleißaktivität im *snu17Δ*-Extrakt rekonstituiert werden kann. Dazu wurde Snu17p zunächst rekombinant als GST-Fusionsprotein in *E.coli* überexprimiert und aufgereinigt (wie in Kapitel 3.2.2.12 beschrieben). Spleißreaktionen wurden, wie oben beschrieben, angesetzt, jedoch wurden die Reaktionsansätze jetzt mit dem rekombinanten GST-Snu17p Protein vorinkubiert. Danach wurde, wieder bei verschiedenen Temperaturen (22°C, 28°C, 32°C), radioaktiv markierte prä-mRNA zugegeben und die Reaktionen wurden nach 25 min Spleißen gestoppt und analysiert (Abb. 67 A). Außerdem wurde in einem weiteren Experiment die Bildung der Spleißprodukte bei 23°C zu verschiedenen Zeitpunkten verfolgt (1, 5, 15 und 25 min.; Abb. 67 B).

In diesem Experiment zeigte sich stets eine Erhöhung der Spleißaktivität im *snu17Δ* Extrakt, wenn das rekombinante Protein zugegen war. Bei 32°C war im *snu17Δ* Extrakt keine Aktivität mehr nachweisbar (Abb. 67 A, Spur 11), Zugabe von GST-Snu17p führte jedoch zu einem deutlichen, wenn auch schwachen Aktivitätszuwachs (Abb. 67 A, Spur 12). Deutlicher war die Aktivitätssteigerung im *snu17Δ* Extrakt bei 28°C (vgl. Spuren 7 und 8 in Abb. 67 A). Interessanterweise hatte die Zugabe von GST-Snu17p aber auch auf den Wildtyp-Extrakt eine positive Wirkung, denn auch dessen Aktivität wurde, zumindest bei den höheren Temperaturen (28 und 32°C), durch Zugabe von GST-Snu17p erhöht (vgl. Abb. 67 A, Spuren 6 und 10 mit 5 und 9). Die Kinetik der Spleißproduktbildung bei 23°C macht den Rekonstitutionseffekt von GST-Snu17p im *snu17Δ* Extrakt noch deutlicher (Abb. 67 B). Hier erhöhte die Zugabe von GST-Snu17p die Spleißaktivität des *snu17Δ* Extraktes bis auf Wildtyp-Niveau (vgl. Spuren 4, 12 und 16), wobei die Produkte im *snu17Δ* Extrakt jedoch mit reduzierter Geschwindigkeit gebildet werden (vgl. Spuren 5-8 mit 13-16).

5 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde erstmals eine umfassende Identifizierung und Charakterisierung der Proteine der spleißosomalen UsnRNPs in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durch biochemische Methoden erreicht. Die biochemische Isolierung einer Mischung aller m₃G-Kappen-tragender Ribonukleoproteinkomplexe der Hefe (UsnRNPs und nukleoläre snoRNPs) mit Hilfe eines m₃G-spezifischen Antikörpers war schon vor Beginn dieser Arbeit gelungen [123]. Hier wurden nun effiziente Methoden entwickelt, um ein bestimmtes snRNP spezifisch zu isolieren. Dazu wurden zunächst durch molekulargenetische Methoden Polyhistidin-Peptide an verschiedenen snRNP-spezifischen Proteinen angebracht. Das gewünschte snRNP wurde dann aus der Mischung der snRNPs und snoRNPs über Ni²⁺-NTA-Chromatographie isoliert und durch Glyzeringradienten-Zentrifugation weiter gereinigt. Die Proteine der gereinigten snRNP-Partikel wurden anschließend durch Peptid-Sequenzierung und Datenbanksuche identifiziert.

Aufgrund der geringen darstellbaren Mengen konnten die Proteine nicht durch Edman-Abbau sequenziert werden. In Zusammenarbeit mit Dr. G. Neubauer und Dr. Matthias Mann (EMBL, Heidelberg) wurde daher die wesentlich empfindlichere massenspektrometrische Peptidsequenzierung verwendet (MALDI-TOF und/oder Nano-Electrospray). Da das Hefegenom vollständig bekannt ist, genügten schon sehr wenig Massen- bzw. Sequenzinformation, um ein analysierte Peptid eindeutig einem bestimmten Genprodukt zuzuordnen zu können. Alle biochemisch isolierten UsnRNP-Proteine konnten so identifiziert werden. Proteine, für die zuvor noch keine Funktion bekannt war, wurden anschließend funktionell untersucht.

Zuerst wurde das U1 snRNP gereinigt und analysiert. Unter den isolierten Proteinen waren alle U1 snRNP-Proteine, die vormals aus genetischen Analysen bekannt waren. Für acht der identifizierten Proteine wurde hier eine Assoziation mit dem U1 snRNP der Hefe erstmals gezeigt. Dieses Partikel ist wesentlich komplexer aufgebaut als sein menschliches Gegenstück. Die Hefe-spezifischen U1 snRNP-Proteine übernehmen in der frühen Phase der Spleißosom-Assemblierung Aufgaben, die beim Menschen von nicht-UsnRNP-Proteinen ausgeübt werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß das Hefe-U1 snRNP in seiner Kernstruktur dem menschlichen Gegenstück entspricht.

Auch das [U4/U6.U5] tri-snRNP der Hefe wurde isoliert und die mit diesem Partikel assoziierten Proteine wurden identifiziert. Unter diesen befanden sich neun unbekannte tri-snRNP-Proteine, einschließlich neuer U6 snRNP-spezifischer Sm-ähnlicher Proteine. Das tri-snRNP der Hefe ist in seiner Komplexität und Proteinkomposition dem des Menschen vergleichbar, es bestehen aber Unterschiede in der strukturellen Organisation. Dies konnte

durch Dissoziation des tri-snRNPs in seine Untereinheiten, sowie durch Isolierung des freien U5 snRNPs gezeigt werden. Für die bis dato unbekannten tri-snRNP-spezifischen Proteine wurde eine Beteiligung am prä-mRNA Spleißen gezeigt. Sie üben ihre Funktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Spleißzyklus aus. Weiterhin wurden ein tetramerer Komplex aus den U2, U4, U5 und U6 snRNPs charakterisiert, sowie zwei unbekannte U2 snRNP-spezifische Proteine identifiziert und ihre Funktion untersucht.

Die erhaltenen Ergebnisse werden hier in der Reihenfolge diskutiert, wie sie im Ergebnisteil beschrieben wurden. Es soll aufgezeigt werden, daß der biochemische Ansatz zur Charakterisierung der Hefe-snRNPs, insbesondere beim U1 snRNP, sehr gut mit den Ergebnissen genetischer Untersuchungen korreliert. Die gewonnenen Resultate werden jeweils mit den Erkenntnissen im Humansystem verglichen. Abschließend soll die Bedeutung der funktionellen Proteomforschung, wie sie hier an Multiproteinkomplexen mit Hilfe der Massenspektrometrie durchgeführt wurde, bewertet werden.

5.1 Das U1 snRNP und seine Proteinkomponenten

Das isolierte U1 snRNP der Hefe enthielt insgesamt 17 spezifisch und stabil assoziierte Proteine. Sieben von diesen sind Orthologe der menschlichen Sm Proteine (B, D1, D2, D3, E, F und G); SmB und D2 wurden hier erstmals als Bestandteil von UsnRNPs der Hefe nachgewiesen. Daraus läßt sich folgern, daß auch das U1 snRNP der Hefe eine 'core' Struktur besitzt, die aus den Sm Proteinen und der U1 snRNA gebildet wird. Aufbauend auf dieser Struktur enthält das Hefe-U1 snRNP zehn Partikel-spezifische Proteine. Unter diesen befinden sich alle Proteine, die auch im menschlichen U1 snRNP vorkommen: Mud1p, Snp1p und yU1C sind die Orthologen der menschlichen U1-A, 70K und C Proteine ([81, 82]; yU1-C wurde hier ebenfalls erstmals als U1 snRNP-Protein der Hefe nachgewiesen). Die sieben restlichen Proteine (Snu71p, Prp39p, Prp40p, Nam8p, Prp42p/Snu65p, Snu56p und Luc7p) sind Hefe-spezifisch und haben keine Orthologen im humanen U1 snRNP. Von diesen sieben Proteinen waren vormals nur Prp39p und Prp40p als U1-assoziiert bekannt [83, 84]. Das Hefe-U1 snRNP ist somit wesentlich komplexer aufgebaut als sein humanes Gegenstück (Tab. 4). Dies konnte anschaulich mit Hilfe der Elektronenmikroskopie gezeigt werden: Das Hefe-U1 snRNP ist nicht nur größer, sondern es hat auch eine gänzlich andere Form als das humane U1-Partikel (Abb. 14). Ein weiteres Protein, Npl3p, das mit dem U1 snRNP koisoliert wurde, bindet nur schwach und relativ unspezifisch an das U1 snRNP, jedoch auch an alle anderen snRNPs. Die Natur seiner Assoziation mit dem U1 snRNP konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Die U1 snRNA der Hefe ist ca. 3,5 mal länger als die menschliche U1 snRNA. Man könnte daher vermuten, daß die Hefe-spezifischen Proteine mit den Hefe-spezifischen Bereichen der U1 snRNA wechselwirken. Für Mud1p und Snp1p ist bekannt, daß sie an Be-

	humanes U1 snRNP	Hefe- U1 snRNP	Sequenzmotive
gemein- same Sm Proteine	Sm B/B'	Sm B	Sm Motive 1 und 2
	Sm D1	Sm D1	Sm Motive 1 und 2
	Sm D2	Sm D2	Sm Motive 1 und 2
	Sm D3	Sm D3	Sm Motive 1 und 2
	Sm E	Sm E	Sm Motive 1 und 2
	Sm F	Sm F	Sm Motive 1 und 2
	Sm G	Sm G	Sm Motive 1 und 2
U1 snRNP- spezifisch	U1-C	yU1-C	Zink-Finger
	U1-A	Mud1p	2x RBD
	U1-70K	Snp1p	RBD
		Snu71p	-
		Prp39p	TPR
		Prp40p	WW
		Nam8p	3xRBD
		Prp42p/Snu65p	TPR
		Snu56p	-
		Luc7p	2x Zink-Finger

Tab. 4: Vergleich der Proteinkompositionen der U1 snRNPs in Mensch und Hefe

Das menschliche U1 snRNP enthält sieben Sm Proteine und drei Partikel-spezifische Proteine. Dagegen finden sich im Hefe-U1 snRNP insgesamt 10 Partikel-spezifische Proteine (und ebenfalls sieben Sm Proteine). Die Sequenz-Motive der einzelnen Proteine sind aufgeführt (vgl. Tab. 3). Das menschliche U1-70K Protein hat noch zusätzlich eine SR-Domäne.

reiche der Hefe-U1 snRNA binden, die auch in der menschlichen U1 snRNA vorhanden sind [183, 184]. Unter den Hefe-spezifischen U1 snRNP-Proteinen befindet sich aber nur eines, Nam8p, das kanonische RNA-Bindungsdomänen enthält. Da die Hefe-spezifischen Bereiche der U1 snRNA nicht essentiell sind [23], muß man annehmen, daß diese Proteine überwiegend über Protein/Protein-Wechselwirkungen an das Partikel gebunden sind. Im Einklang damit enthalten zwei dieser Proteine (Prp39p und Prp42p) TPR-Motive, die solche Wechselwirkungen vermitteln können [168]. Nam8p stabilisiert die Bindung dieser Proteine an das U1 snRNP, wie anhand eines biochemisch isolierten Δ Nam8p-U1 snRNPs gezeigt wurde (Abb. 26). Alle Hefe-spezifischen U1-Proteine, mit Ausnahme von Prp42p/Snu65p, dissoziierten bei Salzkonzentrationen vom Δ Nam8p-U1 snRNP ab, bei denen sie stabil mit dem Wildtyp-Partikel assoziiert sind. Möglicherweise bindet Nam8p mit einer seiner RBDs an die U1 snRNA und stabilisiert die Bindung der anderen Proteine durch Protein/Protein-Wechselwirkungen. Alternativ könnte es eine Konformation des U1 snRNPs induzieren, die die Bindung der anderen Proteine begünstigt. Das durch Salzbehandlung von den Hefe-spezifischen U1-Proteinen befreite Partikel wurde ebenfalls durch Elektronenmikroskopie untersucht. Die Struktur dieses Partikels ähnelt in Form und Größe stark der des menschlichen U1 snRNPs (im Gegensatz zum Wildtyp-U1 snRNP; vgl. Abb. 14 und Abb. 27). Dies kann als Hinweis dafür gelten, daß die Grundstruktur des U1 snRNPs in beiden Spezies erhalten ist,

was im Einklang mit der grundsätzlich gleichen Funktion des U1 snRNPs bei der Erkennung der 5' -Spleißstelle steht. Die Spezies-spezifischen Unterschiede in dieser frühen Phase der Spleißosom-Assemblierung manifestieren sich in der tragenden Rolle, die hier beim Menschen den SR-Proteinen zukommt. SR-Proteine kommen in der Hefe nicht vor, so daß man vermuten könnte, daß die zusätzlichen U1 snRNP-Komponenten in der Hefe die Funktionen dieser Proteine übernehmen (s. unten).

5.1.1 Biochemie und Genetik korrelieren bei der Identifizierung von U1 snRNP-Proteinen

Durch die biochemische Isolierung und massenspektrometrische Analyse konnten die Proteine des U1 snRNPs in sehr kurzer Zeit identifiziert werden. In einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Rosbash wurde parallel durch genetische Methoden ebenfalls nach zusätzlichen U1 snRNP-Proteinen gesucht [153]. Hierzu wurden Hefestämme verwendet, die U1 snRNAs mit bestimmten Mutationen exprimieren, welche alleine zunächst keinen Phänotyp erzeugen. Diese Hefestämme wurden dann mutagenen Bedingungen ausgesetzt. Wurden dabei Gene verändert, die U1 snRNP-Proteine kodieren, so konnten diese sekundären, allein ebenfalls "unschädlichen" Mutationen in Kombination mit der U1 snRNA-Mutation zu einem letalen Phänotyp führen ("synthetische Letalität") [37]. Drei der so gewonnenen Mutanten, *mud10*, *mud15* und *mud16*, erwiesen sich als identisch zu *SNU56*, *NAM8* und *PRP42/SNU65*. Die mutierten Gene wurden durch PCR isoliert und sequenziert. So enthielt *mud15/nam8* aufgrund der Mutagenese ein Stopcodon kurz nach der ersten RBD, während *mud10/snu56* eine Mutation enthielt, die im Protein an Position 125 zur Änderung eines Serins in ein Phenylalanin führte [153]. Zur gleichen Zeit wurde im Labor von Dr. Iain Mattaj am EMBL in einem anderen genetischen Screen nach Mutationen gesucht, die in Kombination mit dem Verlust der Proteine Gcr3p und Mud13p zu synthetischer Letalität führen. Diese beiden Proteine binden die m⁷G-Kappe der prä-mRNAs und stabilisieren durch Wechselwirkungen mit dem U1 snRNP den Commitment-Komplex (vgl. Abb. 8). Auch in diesem Screen wurden mehrere der U1 snRNP-spezifischen Proteine identifiziert, u.a. Luc7p, Nam8p (Luc3p), Snu56p (Lucp4p) und Snu71p (Luc5p) [154].

Die biochemischen Methoden zur Identifizierung der Hefe-UsnRNP-Proteine korrelierten also sehr gut mit den genetischen, es wurden keine widersprüchlichen Resultate erhalten. Die Tatsache, daß alle Proteine, die durch die verschiedenen genetischen Screens gefunden wurden ("PRP", "MUD", "LUC"), sich auch im biochemisch isolierten U1 snRNP nachweisen ließen, verdeutlicht die Verlässlichkeit und Validität des biochemischen Ansatzes zur Identifizierung von Hefe-UsnRNP-Proteinen. In keinem der genetischen Screens wurden jedoch alle Proteine des U1 snRNPs auf einmal identifiziert. Darüberhinaus sind die Entwicklung eines geeigneten Systems für einen genetischen Screen sowie seine Auswertung

sehr langwierig. Die Analyse biochemisch isolierter UsnRNPs führt dagegen in sehr kurzer Zeit zur Identifizierung aller Proteine des entsprechenden Partikels, vorausgesetzt, sie sind stabil assoziiert und werden in genügend großer Menge isoliert. Dies konnte hier am U1 snRNP überzeugend demonstriert werden. Um die massenspektrometrisch identifizierten Peptide schnell zuordnen zu können, muß das Genom des entsprechenden Organismus bekannt sein. So kann eine langwierige Klonierung der cDNAs vermieden werden.

5.1.2 Funktionelle Analyse der neuen Hefe-U1 snRNP-Proteine

Snu71p, Snu56p und insbesondere Nam8p wurden hier eingehender charakterisiert. Alle drei Proteine binden sehr stabil an das U1 snRNP, wie durch Immunpräzipitationsexperimente mit spezifischen Antikörpern gezeigt werden konnte (Abb. 22). Durch Gen-Deletionen wurde gezeigt, daß Snu71p und Snu56p essentiell für das vegetative Wachstum der Zelle sind (siehe Abb. 23 und [153]), Nam8p jedoch nicht (vgl. mit [155]).

Nam8p war bereits früher studiert worden. So konnte seine Überexpression Spleißdefekte in mutierten Gruppe II Introns aufheben [155]. Desweiteren war entdeckt worden, daß die Funktion von Nam8p während der Meiose essentiell ist, da sie notwendig für das Spleißen des Meiose-spezifischen Transkriptes *MER2* ist [156, 157]. Das Intron dieses Gens enthält eine nicht-kanonische 5' -Spleißstelle, die nur eine schwache Wechselwirkung mit der U1 snRNA eingehen kann. Diese schwache Wechselwirkung wird z.T. durch ein RNA-bindendes Protein, Mer1p, stabilisiert, welches nur während der Meiose exprimiert wird und somit das Spleißen von *MER2* - Meiose-spezifisch - reguliert [159]. Die Effizienz des Spleißens von *MER2* wird aber ebenfalls durch Mutationen in der zweiten RBD von Nam8p beeinträchtigt. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß Nam8p ebenfalls an der Stabilisation der Wechselwirkung zwischen der 5' -Spleißstelle und der U1 snRNA beteiligt ist, auch wenn dies bei kanonischen 5' -Spleißstellen nicht nötig ist. Im Einklang mit dieser Annahme konnte in einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Dr. B. Séraphin (EMBL, Heidelberg) direkt nachgewiesen werden, daß Nam8p für die Stabilität der Bindung des U1 snRNPs an die prä-mRNA, insbesondere bei nicht-kanonischen 5' -Spleißstellen entscheidend ist [185]. Dort wurde gezeigt, daß Nam8p das Intron in einem nicht-konservierten Sequenzbereich stromabwärts der 5' -Spleißstelle bindet. Dabei wurde eine Präferenz von Nam8p für Uridylsäure-reiche Sequenzen in diesem Bereich beobachtet: 5' -Spleißstellen mit solchen stromabwärts gelegenen Sequenzen wurden verstärkt gespleißt, wenn dem U1 snRNP zwei ansonsten identische 5' -Spleißstellen zur Auswahl standen. Diese Eigenschaften von Nam8p erinnern an die Funktionen, die SR-Proteine bei der Erkennung und Auswahl von 5' -Spleißstellen im humanen Spleißprozeß spielen. Auch die SR-Proteine binden bestimmte "Verstärker"-Sequenzen in der Nähe von 5' -Spleißstellen. Dies tun sie zunächst unabhängig vom U1 snRNP, führen es dann aber durch Interaktionen mit U1 snRNP-Proteinen gleichsam

zu diesen Spleißstellen hin. SR-Proteine sind auch verantwortlich für die Stabilisierung der Interaktion von U1 snRNP und 5' -Spleißstelle. Nam8p hat ebenfalls solche Funktionen, die es allerdings als fest assoziierter Bestandteil des Hefe-U1 snRNPs ausübt. So konnte gezeigt werden, daß Nam8p zur Stabilisierung des Commitment-Komplexes beiträgt, wenn die prä-mRNA keine m⁷G-Kappe besitzt und somit Mud13p und Gcr3p nicht im Commitment-Komplex enthalten sind ([185]). Nam8p könnte somit als integrales U1 snRNP-Protein in der Hefe Funktionen ausüben, die beim Menschen von nicht-UsnRNP-Proteinen übernommen werden. Ähnliches gilt für Snu56p, wie anhand der *mud10/snu56*-Mutante im genetischen Hintergrund einer Wildtyp-U1 snRNA gezeigt werden konnte. Ein Extrakt aus diesem Hefestamm zeigte *in vitro* eine deutlich reduzierte Fähigkeit zur Bildung des Commitment-Komplexes [153].

Weitere Hinweise für eine Rolle von Nam8p zur Stabilisierung der Wechselwirkung des U1 snRNPs mit nicht-kanonischen 5' -Spleißstellen konnten bei der näheren Untersuchung der *nam8/mud15*-Mutation gewonnen werden. Es wurde untersucht, ob diese Mutation das Spleißen eines Reportergens *in vivo* beeinflusst. Es wurden Reportergene eingesetzt, die unterschiedliche Introns enthielten, unter anderem eines mit einer Mutation in der 5' -Spleißstelle. Dieses Intron wurde im Hefestamm mit der *nam8/mud15*-Mutation viel ineffizienter gespleißt, als in einem Wildtyp-Stamm, während ein Intron mit kanonischer 5' -Spleißstelle in beiden Hefestämmen normal gespleißt wurde [153]. Auch die *snu56/mud10*- sowie die *snu65/mud16*-Mutanten wiesen für das nicht-kanonische Intron eine (leicht) reduzierte Spleißaktivität auf.

Wie bereits oben erwähnt, führte die Deletion von *NAM8* zu einer Destabilisierung des gesamten U1 snRNPs. Insbesondere die Hefe-spezifischen U1 snRNP-Proteine Snu71p, Snu56p, Prp39p, Prp40p und Luc7p waren schwächer an das Δ Nam8p-U1 snRNP gebunden als im Wildtyp-U1 snRNP. Im Einklang damit zeigte das U1 snRNP in der *nam8/mud15*-Mutante bei gelelektrophoretischer Auftrennung unter nativen Bedingungen ein stark aberrantes Migrationsverhalten (im Vergleich zum Wildtyp; [153]). Die Assoziation des Prp42p/Snu65p Proteins mit dem U1 snRNP wurde dagegen durch die Abwesenheit von Nam8p im Vergleich zum Wildtyp-U1 snRNP stabilisiert. Prp42p ist normalerweise sehr schwach gebunden und läßt sich durch Immunpräzipitation nur bei geringen Salzkonzentrationen als Teil des U1 snRNPs nachweisen (siehe [153, 168]). Der Grund für das Nam8p-abhängige Assoziationsverhalten von Prp42p/Snu65p ist unklar. Möglicherweise konkurriert Prp42p mit Nam8p um die gleiche Bindungsstelle, oder aber das Fehlen von Nam8p induziert eine Konformation des U1 snRNPs, die eine stabilere Bindung des Prp42p Proteins ermöglicht. Prp42p und Nam8p könnten z.T. redundante Funktionen im U1 snRNP haben, so daß Prp42p die fehlende Funktion von Nam8p in der Deletionsmutante kompensieren kann.

Von den 17 U1 snRNP-Proteinen sind bis auf Nam8p und Mud1p alle essentiell für vegetatives Wachstum und die prä-mRNA Spleißreaktion. Dies betont die essentielle Bedeutung dieser Proteine für die Funktion des U1 snRNP-Partikels in der Formierung von Spleißosomen. Mehrere der Hefe-spezifischen U1 snRNP-Proteine stabilisieren die Wechselwirkung des U1 snRNPs mit der prä-mRNA. Dies konnte für Nam8p und Snu56p, aber auch für Luc7p [154] gezeigt werden. Konsistent damit wurde kürzlich von Zhang und Mitarbeitern [15] demonstriert, daß sieben Proteinkomponenten des U1 snRNPs (Nam8p, Snu56p, Snp1p, yU1C, SmB, SmD1 und SmD3) im Commitment-Komplex direkt die prä-mRNA kontaktieren. Zwei von diesen Proteinen (Nam8p und Snu56p) haben keine Gegenstücke im humanen U1 snRNP. Hier könnten also andere Proteine, die nicht mit dem U1 snRNP assoziiert sind, die Funktionen von Nam8p und Snu56p übernehmen. Die besten Kandidaten für solche Funktionen sind, wie schon erwähnt, die SR-Proteine. Die Hefe-spezifischen U1 snRNP-Proteine könnten daher ähnliche Funktionen wie die SR-Proteine haben.

Was könnte der Grund für die hohe Komplexität des Hefe-U1 snRNPs im Vergleich zum menschlichen U1 snRNP sein? Im Gegensatz zum Hefe-Partikel muß das menschliche U1 snRNP eine enorme Vielzahl von Introns mit sehr variablen 5' -Spleißstellen erkennen und binden können. Darüberhinaus muß es zwischen alternativen 5' -Spleißstellen diskriminieren. Das menschliche U1 snRNP benötigt zur Erkennung und Auswahl der verschiedenen Spleißstellen weitere, nicht-assoziierte Proteinfaktoren, die je nach Intron verschiedene Spezifitäten bei der Erkennung der Spleißstellen vermitteln (dies sind unter anderem Aufgaben der SR-Proteine). Das humane U1 snRNP könnte somit nur eine "Kernaktivität" darstellen, die jeweils durch zusätzliche Faktoren abgestimmt und vervollständigt werden muß. SR-Proteine können in besonderen Fällen sogar die negativen Effekte einer Depletion des U1 snRNPs ausgleichen [186]. Das Hefe-U1 snRNP findet dagegen fast nur Substrate vor, die hoch konservierte Erkennungssequenzen tragen. Daher könnten die für das Spleißen der meisten Introns benötigten Faktoren bereits fest an das U1 snRNP gebunden sein und müßten nicht jedesmal einzeln rekrutiert werden. In den vermutlich seltenen Fällen von reguliertem Spleißen (in der Hefe) werden dann, wie vermutlich auch beim humanen U1 snRNP, weitere Faktoren hinzugezogen (z.B. Mer1p beim Spleißen des *MER2* Introns). Das würde bedeuten, daß das Hefe-U1 snRNP in sich die gleiche "Kernaktivität" trägt, die durch das humane U1 snRNP dargestellt wird. Dies scheint tatsächlich der Fall zu sein, wie hier anhand der überraschenden Ähnlichkeit der Strukturen des Δ Nam8p-U1 snRNPs, welches von den Hefe-spezifischen Proteinen befreit wurde, und des humanen U1 snRNP-Partikels gezeigt werden konnte.

5.2 Das [U4/U6.U5] tri-snRNP und seine Proteinkomponenten

Das [U4/U6.U5] tri-snRNP konnte aus zwei verschiedenen Hefestämmen isoliert werden (ein Stamm exprimiert ein Octahistidin-Peptid am U4/U6-Protein Prp4p, der andere ein Hexahistidin-Peptid am U5-Protein Snu114p). Beide Partikel enthielten die gleichen Proteine, aufgrund der höheren Ausbeute wurde jedoch nur der erste Stamm (W303-Prp4p-8xHis) zur Identifikation dieser Proteine verwendet. Aus den Ergebnissen der massenspektrometrischen Peptidsequenzierung folgte, daß das [U4/U6.U5] tri-snRNP der Hefe mindestens 35 Proteine enthält (siehe Tab. 5). Zusammen mit den drei snRNAs ergibt sich ein berechnetes Molekulargewicht des Hefe-tri-snRNPs von 1,5 MDa, die snRNAs machen dabei nur 1/10 der Masse aus. Die Proteine des tri-snRNPs teilen sich in folgende Gruppen auf:

- I. Zwei mal sieben Sm Proteine, die mit den U4 und U5 snRNAs assoziiert sind;
- II. Weitere sieben U6 snRNA-spezifische, Sm-ähnliche (Lsm) Proteine (siehe unten);
- III. 14 Proteine, die Partikel-spezifisch mit dem tri-snRNP assoziiert sind.

Die 14 Partikel-spezifischen Proteine können, basierend auf dem Dissoziationsverhalten des tri-snRNPs in einem Glyzeringradienten bei 400 mM Salz (Abb. 59), in drei Gruppen eingeordnet werden: Drei Proteine bleiben mit dem U5 snRNP assoziiert (Prp8p, Snu114p und vermutlich Dib1p/Snu16p), fünf Proteine sind U4/U6 snRNP-spezifisch (Prp6p, Prp31p, Prp3p, Prp4p und Snu13p), die sechs restlichen Proteine dissoziieren von allen snRNPs ab (Brr2p/Snu246p, Snu66p, Spp381p, Snu23p, Prp38p und Prp18p). Dies konnte zwar nicht für alle Proteine eindeutig gezeigt werden: Snu16p, Snu13p, Snu23p, Prp18p und Prp38p migrieren auf SDS-Gelen zusammen mit anderen Proteinen, so daß hier spezifische Antikörper nötig wären, um die Kosedimentation dieser Proteine mit U5 oder U4/U6 snRNPs genauer zu untersuchen. Durch Immunpräzipitation konnte aber für drei dieser Proteine gezeigt werden, daß sie bei der verwendeten Salzkonzentration nicht mehr mit snRNPs assoziiert sind (Snu23p: Abb. 38; Prp18p: [96]; Prp38p: [98]). Snu16p und Snu13p verhalten sich vermutlich wie ihre humanen Orthologen und verbleiben wahrscheinlich an die U5 bzw. U4/U6 snRNPs gebunden. Für einige der schwach assoziierten Proteine konnte nach RNaseH-Verdau der einzelnen snRNAs ein primärer Bindungspartner im tri-snRNP identifiziert werden. So sind Snu66p und Prp18p primär am U5 snRNP gebunden (siehe Kapitel 4.4.6.2 und [96]), Spp381p hat vermutlich Kontakte zu den U5 und (eventuell) U4 snRNPs, während Snu23p direkt mit dem U4 snRNP assoziiert ist (Kapitel 4.4.6.2).

Interessanterweise ist Prp6p in der Hefe mit dem U4/U6 Partikel assoziiert, während sein humanes Orthologes (U5-102kD) an das U5 snRNP bindet. Dieses Protein könnte also im tri-snRNP gleichzeitig mit den U5 und U4/U6 snRNPs wechselwirken und somit gleichsam als Interphasenprotein für die Formierung des tri-snRNPs aus U5 und U4/U6

snRNPs verantwortlich sein. Im Einklang damit enthalten Prp6p und das U5-102kD Protein zahlreiche TPR-Motive, die Protein/Protein-Wechselwirkungen vermitteln können.

Homo sapiens						Saccharomyces cerevisiae				
Protein	frei	U4/U6	U5	U4/U6.U5	Sequenzmotive	U4/U6.U5	U5	U4/U6	frei	Protein
Sm B/B'		●	●	●	Sm Motive 1 & 2	●	●	●		Sm B
Sm D1		●	●	●	Sm Motive 1 & 2	●	●	●		Sm D1
Sm D2		●	●	●	Sm Motive 1 & 2	●	●	●		Sm D2
Sm D3		●	●	●	Sm Motive 1 & 2	●	●	●		Sm D3
Sm E		●	●	●	Sm Motive 1 & 2	●	●	●		Sm E
Sm F		●	●	●	Sm Motive 1 & 2	●	●	●		Sm F
Sm G		●	●	●	Sm Motive 1 & 2	●	●	●		Sm G
Lsm 2		●		●	Sm Motive 1 & 2	●		●		Lsm2p
Lsm 3		●		●	Sm Motive 1 & 2	●		●		Lsm3p
Lsm 4		●		●	Sm Motive 1 & 2	●		●		Lsm4p
Lsm 5		●		●	Sm Motive 1 & 2	●		●		Lsm5p
Lsm 6		●		●	Sm Motive 1 & 2	●		●		Lsm6p
Lsm 7		●		●	Sm Motive 1 & 2	●		●		Lsm7p
Lsm 8		●		●	Sm Motive 1 & 2	●		●		Lsm8p
U5-220kD			●	●	-	●	●			Prp8p
U5-200kD			●	●	2x DEXD/H	●				Brr2p
U5-116kD			●	●	G-Domäne	●	●			Snu114p
U5-110kD			●	●	-	●				Snu66p
U5-102kD			●	●	TPR, Zink-Fing.	●		●		Prp6p
U5-100kD			●	●	SR, DEXD/H				●	Prp28p
U5-65kD			●	●	-					
U5-52kD			●		-					
					-		●			Aar2p
U5-40kD			●	●	WD-40					
27kD			●	●	SR					
U5-15kD			●	●	Thioredoxin	●	●			Dib1p/Snu16p
hPrp18p	●				-	●				Prp18p
					PEST	●				Spp381p
					-	●				Prp38p
					Zink-Finger	●				Snu23p
U4/U6-90kD		●		●	-	●		●		Prp3p
U4/U6-61kD		●		●	-	●		●		Prp31p
U4/U6-60kD		●		●	WD-40	●		●		Prp4p
SnuCyp-20		●		●	Cyclophilin					
U4/U6-15.5kD		●		●	RNA-bindend	●		●		Snu13p

Tab. 5: Vergleich der Proteinzusammensetzung der [U4/U6.U5] tri-snRNPs in Mensch und Hefe

Die orthologen Proteine der [U4/U6.U5] tri-snRNPs des Menschen und der Hefe sind einander in dieser Tabelle gegenübergestellt (grau unterlegte Spalten). Zusätzlich ist in dieser Tabelle die strukturelle Organisation der snRNP-Untereinheiten der tri-snRNPs (freie U5 sowie U4/U6 snRNPs) zusammengefasst. Die Assoziation der einzelnen Proteine mit den jeweiligen snRNP-Partikeln ist durch ausgefüllte Kreise dargestellt. Prp18p ist nur in der Hefe, das humane Orthologe von Prp28p (U5-100kD) ist nur beim Menschen mit snRNPs assoziiert. Die Assoziation von Dib1p mit dem freien U5 snRNP ist nicht geklärt, das menschliche 27kD Protein ist nur unter bestimmten Bedingungen mit dem U5 snRNP assoziiert. Die Sequenzmotive der einzelnen Proteine sind, soweit bekannt, in der mittleren Spalte aufgeführt (vgl. Tab. 3). Die SR-Domäne des menschlichen U5-100kD Proteins kommt in Prp28p nicht vor, umgekehrt besitzt das humane Prp6p-Orthologe kein Zinkfinger-Motiv.

Der Vergleich der Proteinkompositionen der [U4/U6.U5] tri-snRNPs in Mensch und Hefe zeigt, daß die tri-snRNPs, im Gegensatz zu den U1 snRNPs, sehr ähnlich aufgebaut sind. Nur für drei der 35 Hefe-tri-snRNP-Proteine (Spp381p, Prp38p und Snu23p) konnten bislang keine stabil gebundenen Orthologe im menschlichen tri-snRNP identifiziert werden. Es existieren aber menschliche ESTs, die ein mögliches Orthologes von Snu23p kodieren könnten, was womöglich nicht mit dem Partikel assoziiert ist. Präzedenzfälle für solch ein Verhalten sind die Proteine hPrp18p und Prp28p, die jeweils in der einen Spezies mit dem tri-snRNP assoziiert sind, in der anderen jedoch nicht. Im menschlichen tri-snRNP befinden sich

ebenfalls nur drei Proteine, die keine Orthologen in der Hefe haben (die Proteine von 40, 27 und 20 kDa). Größere Unterschiede zwischen den tri-snRNPs der beiden Spezies finden sich nur bezüglich der strukturellen Organisation. So sind beim Menschen wesentlich mehr tri-snRNP Proteine stabil auch mit dem freien U5 snRNP assoziiert (insgesamt 10), während in der Hefe nur drei Proteine an das freie U5 snRNP gebunden bleiben. Die sehr ähnliche Zusammensetzung der tri-snRNPs in den beiden Spezies konnte auch "visuell" bestätigt werden: Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben, daß beide Partikel in Größe und Form sehr ähnlich sind (Abb. 37). Beide Partikel besitzen eine vergleichbare Struktur, die sich aus zwei elongierten Domänen zusammensetzt, die an einem Ende verbunden sind. Im Hefe-Partikel ist die "Furche" zwischen den beiden Domänen deutlicher ausgeprägt. Im menschlichen tri-snRNP könnte an der entsprechenden Stelle das 100kDa-Protein positioniert sein, dessen Hefe-Ortholog (Prp28p) nicht teil des tri-snRNPs ist, und die "Furche" mit seiner Masse ausfüllen.

Insgesamt konnten hier neun vormals unbekannte Hefe-tri-snRNP-Proteine identifiziert werden. Darunter befinden sich vier neue Lsm Proteine (Lsm2, 5, 6 und 7p), sowie die Proteine Snu66p, Spp381p, Snu23p, Dib1p/Snu16p und Snu13p. Die Eigenschaften und Funktionen dieser neuen Proteine sollen im folgenden eingehend diskutiert werden.

5.2.1 Sieben Lsm Proteine sind Bestandteil des [U4/U6.U5] tri-snRNPs der Hefe

Die U6 snRNA ist die am besten konservierte spleißosomale RNA, was eine essentielle Funktion dieser RNA im Spleißprozeß vermuten läßt. Erstaunlicherweise konnten aber in der Vergangenheit, trotz der effizienten Methoden zur Isolierung menschlicher snRNPs, keine Human-Proteine gefunden werden, die spezifisch mit der U6 snRNA interagieren. In der Hefe wurde durch genetisches Screening zumindest ein RNA-bindendes Protein identifiziert, das mit der U6 snRNA wechselwirkt (Prp24p; [80]). Prp24p ist nur mit dem freien U6 snRNP assoziiert. Es unterstützt die Formierung der U4/U6 snRNA-Helices und somit des U4/U6 snRNPs, von dem es dann aber sofort abdissoziiert [19]. Zwar ist die U6 snRNA als Teil des U4/U6 snRNPs mit Proteinen komplexiert, zumindest einige dieser Proteine dissoziieren aber zusammen mit der U4 snRNA vom Spleißosom ab, wenn es aktiviert wird (z.B. Prp4p; [129]). Angesichts der großen Bedeutung der Proteine im Spleißprozeß erschien es unwahrscheinlich, daß die U6 snRNA nicht auch mit U6-spezifischen Proteinen wechselwirkt. Daher erregte die Entdeckung von zwei Proteinen, Uss1p und SmX4p, die spezifisch mit der U6 snRNA assoziiert sind, im Jahr 1995 für Aufsehen [78, 79]. Diese Proteine enthielten Sequenz-Motive, die denen der Sm Proteine sehr ähnlich waren. Dies legte die Vermutung nahe, daß die U6 snRNA, in Analogie zu den anderen snRNAs, ebenfalls mit einem heteromeren Komplex von Sm(-ähnlichen) Proteinen assoziiert

sein könnte. Diese Proteine könnten, ebenso wie die kanonischen Sm Proteine bei den übrigen snRNAs, Funktionen bei der Biogenese und Stabilisierung der U6 snRNA ausüben. Die vollständige Sequenzierung des Hefegenoms erlaubte schließlich eine umfassende Suche nach weiteren Proteinen mit Sm-Motiven. Dabei wurden insgesamt neun Sm-ähnliche Proteine gefunden [39]. Eines dieser Proteine wurde zwischenzeitlich als Teil des U6 snRNPs nachgewiesen (Lsm8p; Lsm = like-Sm; [103]). Ein weiteres Lsm Protein ist direkt oder indirekt am cytoplasmatischen Abbau von mRNAs beteiligt: Für Lsm1p konnte eine genetische Interaktion mit *DCP1* nachgewiesen werden. Dieses Gen kodiert für ein Enzym, welches die Kappen der mRNAs entfernt [187]. Dies legt nahe, daß Lsm Proteine auch an anderen zellulären Prozessen als dem prä-mRNA Spleißen beteiligt sein könnten.

Durch Immunpräzipitation konnte für Lsm3p (vormals SmX4p), Lsm4p (Uss1p) und Lsm8p gezeigt werden, daß sie nicht nur mit der U6 snRNA, sondern in geringerem Maße auch mit den U4 und U5 snRNAs assoziiert sind [78, 79, 103]. Es war jedoch nach wie vor unbekannt, ob auch noch andere Lsm Proteine mit den U6, U4/U6 und [U4/U6.U5] tri-snRNPs assoziiert sind. In dieser Arbeit konnte nun für vier weitere Lsm Proteine (Lsm2p, Lsm5p, Lsm6p und Lsm7p) demonstriert werden, daß sie Bestandteil des tri-snRNPs sind (auch Lsm4p und Lsm8p konnten nachgewiesen werden). Die Gesamtzahl an Lsm Proteinen im tri-snRNP ist somit mindestens sieben. Es läßt sich ausschließen, daß die Identifikation der Lsm Proteine im tri-snRNP-Isolat von koisolierten U4/U6 snRNPs herrührt. Zwar könnten diese im zweiten Isolierungsschritt über das Protein Prp4p, das mit dem U4/U6 snRNP assoziiert ist, zusammen mit dem tri-snRNP gereinigt werden. Jedoch enthielten auch die tri-snRNPs, welche über das U5 snRNP-spezifische Snu114p isoliert wurden, die gleichen Proteine. Auch eine Koisolierung der Lsm Proteine als Teile des freien U6 snRNPs ist auszuschließen, da dieses snRNP im ersten Isolierungsschritt von den H20 Antikörpern nicht gebunden wird (die U6 snRNA hat keine m₃G-Kappe). Obwohl es sehr wahrscheinlich ist, daß die sieben Lsm Proteine als Heptamer direkt mit der U6 snRNA komplexiert sind, wurde dafür hier kein Beweis erbracht. Inzwischen wurde die Assoziation der sieben Lsm Proteine (Lsm2-8p) mit den U6, U4/U6 und [U4/U6.U5] snRNPs auch in zwei anderen Laboratorien durch Immunpräzipitation demonstriert [170, 171]. Signifikanterweise konnte kürzlich die Assoziation von sieben Lsm Proteinen auch mit dem menschlichen [U4/U6.U5] tri-snRNP nachgewiesen werden [172]. Es bleibt weiterhin unklar, ob die Lsm Proteine in einer ähnlichen Weise miteinander interagieren, wie es in einem Modell für die Sm Proteine postuliert wurde (siehe Einleitung und [41]). Dafür spricht jedoch folgendes: Die menschlichen Lsm Proteine konnten als RNA-freies Partikel isoliert und durch Elektronenmikroskopie untersucht werden. Die Struktur dieses Partikels hat signifikante Ähnlichkeit mit Sm core Partikeln (vgl. Abb. 5), so daß in der Tat von einem sehr ähnlichen Strukturprinzip der heteromeren Sm und Lsm Protein-Komplexe ausgegangen werden kann.

5.2.2 Neue [U4/U6.U5] tri-snRNP-Proteine in der Hefe

Die anderen fünf neuen tri-snRNP-Proteine der Hefe sind Snu66p, Spp381p, Snu23p, Dib1p/Snu16p und Snu13p. Dib1p/Snu16p und Snu13p sind die hochkonservierten Orthologen der menschlichen tri-snRNP-Proteine U5-15kD und U4/U6-15.5kD. Die humanen Proteine wurden in unserem Labor eingehend charakterisiert und für die Hefe-Orthologen konnte gezeigt werden, daß sie essentiell für das vegetative Wachstum und das prä-mRNA Spleißen sind (S.Nottrott und P.Fabrizio, persönliche Mitteilung). Mit der funktionellen Charakterisierung von Snu66p, Spp381p und Snu23p wurde in dieser Arbeit begonnen. Spp381p war zeitgleich von Lybarger und Mitarbeitern [177] durch genetische Methoden als high-copy Suppressor einer temperatursensitiven Mutante des tri-snRNP-Proteins Prp38p identifiziert worden. Die neuen Hefe-tri-snRNP-Proteine, jedoch keine weiteren, wurden unabhängig auch im Labor von Prof. J. Abelson (UCLA) in biochemisch gereinigten tri-snRNPs identifiziert [188]. Somit ist es nicht unwahrscheinlich, daß nun alle tri-snRNP-Proteine der Hefe identifiziert sind (Tab. 5). Natürlich könnten schwach assoziierte Proteine der Identifizierung durch einen biochemischen Ansatz entgehen. So wurde Prp18p nur durch Western Blot-Analyse am oberen Ende des Gradienten identifiziert, da es bei der verwendeten Salzkonzentration vom tri-snRNP abdissoziiert war.

5.2.2.1 Dib1p/Snu16p

Die Funktion von Dib1p/Snu16p wurde hier nicht untersucht, da sein humanes Orthologes (U5-15kD) in unserem Labor bereits näher analysiert wurde. Dib1p/Snu16p ist evolutionär hochkonserviert, Homologe dieses Proteins finden sich in vielen Spezies [174]. Dib1p/Snu16p und U5-15kD weisen eine hohe Homologie in der Primärstruktur auf (76%; vgl. Abb. 35). Die beiden Proteine sind funktionell äquivalent, da das Maus-Orthologe von Dib1p/Snu16p den letalen Effekt der Gen-Deletion von Dib1p/Snu16p in der Hefe aufheben kann [174]. U5-15kD wurde im Labor von Dr. R. Ficner (IMT, Marburg) kristallisiert und seine Struktur aufgeklärt. Dabei fiel eine starke Ähnlichkeit mit Thioredoxin auf, die sich auch im Vergleich der Proteinsequenz zeigt (Abb. 35; [68]). Im Gegensatz zu Thioredoxin hat das U5-15kD Protein hydrophobe Bereiche auf seiner Oberfläche, die möglicherweise für Protein/Protein-Wechselwirkungen benutzt werden, sowie einen basischen Bereich, der nicht im klassischen Thioredoxin zu finden ist. Interessanterweise konnte von Berry und Mitarbeitern gezeigt werden, daß eine Punktmutation in dieser Region des Proteins im *S.pombe*-Ortholog von Dib1p/Snu16p, Dim1p, zu einer Blockade des Zellzyklus führt [174] (eine Beteiligung von Dim1p an der Spleißreaktion wurde nicht untersucht). Dieser Befund weist auf eine möglicherweise kritische Wechselwirkung der basischen Proteindomäne mit RNA oder anderen Proteinen hin. Da die Depletion von Dib1p/Snu16p *in vivo* zu einer starken Akkumulation ungespleißter prä-mRNA führt [68], ist diese Wechselwirkung

wahrscheinlich primär im Spleißosom wichtig. Dieses Ergebnis legt nahe, daß es sich bei dem Zellzyklus-Defekt der Dim1p Mutante um einen indirekten Effekt handelt. Proteine, die direkt an der Zellzyklus-Kontrolle beteiligt sind, könnten aufgrund eines Spleißdefektes depletiert werden, wenn deren Gene Introns enthalten. Diese Introns weisen möglicherweise Besonderheiten auf, die z.B. eine Zellzyklus-spezifische Spleißregulation ermöglichen könnten (ähnlich wie das Spleißen von *MER2* Meiose-spezifisch reguliert ist; siehe Kapitel 5.1.2). Solche Introns, die z.B. nicht-kanonische Spleißstellen enthalten, könnten besonders anfällig für Spleißdefekte sein. Diese Annahme steht im Einklang mit den Ergebnissen von Berry und Mitarbeitern [178]. Sie fanden, daß eine Untereinheit des an der Zellzyklus-Kontrolle beteiligten APC/C (anaphase-promoting complex) in Abwesenheit von Dim1p depletiert wird. In der Literatur der vergangenen Jahre wurden immer wieder mögliche Verbindungen zwischen den Prozessen der Zellzyklus-Kontrolle und des prä-mRNA Spleißens berichtet [189-192]. Ob es sich dabei tatsächlich nur um sekundäre Effekte von Spleißinhibitionen handelt, die die Zellzyklus-Kontrolle beeinflussen, muß noch geklärt werden.

5.2.2.2 Snu13p

Auch Snu13p wurde hier nicht im Hefesystem analysiert, da sein menschliches Orthologes, das 15.5kD Protein, im Humansystem detailliert untersucht wurde. Beide Proteine teilen eine Homologie von über 80 % (vgl. Abb. 36). Das 15.5kD Protein besitzt eine zentrale, RNA-bindende Domäne, die keinem bislang bekannten RNA-Bindungsmotiv entspricht, und bindet spezifisch die 5' -terminale Haarnadelschleife der U4 snRNA[72]. Da die U4 snRNA Haarnadelschleife I in Mensch und Hefe fast identisch ist (Abb. 68) und das 15.5kD Protein auch die Hefe-U4 snRNA bindet, kann man von identischen Funktionen der beiden Proteine in Mensch und Hefe ausgehen. Das humane 15.5kD Protein ist ein integraler Bestandteil des U4/U6 snRNPs und des tri-snRNPs. In beiden Partikeln ist das Protein für polyklonale Antikörper nicht zugänglich, d.h. es wird vermutlich von anderen Proteinen bedeckt. Signifikanterweise ist das 15.5kD Protein das erste U4/U6-Protein, für das eine spezifische RNA-Bindungsaktivität eindeutig nachgewiesen werden konnte. So war zwar bekannt, daß die Deletion der Haarnadelschleife I die Interaktion der U4 snRNA mit dem Hefe-Protein Prp4p unterbindet [193]. Prp4p selbst enthält jedoch keine RNA-Bindungsmotive und eine direkte Interaktion von Prp4p mit der U4 snRNA konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Das humane 15.5kD Protein bzw. das Hefe-Protein Snu13p könnte somit einen strukturellen "Nukleationsfaktor" für das U4/U6 Partikel bzw. seine Proteine darstellen. Durch seine direkte Bindung an die U4 snRNA könnte es als "Bindungs-Plattform" für die übrigen U4/U6 snRNP Proteine dienen, die es durch Protein/Protein-Wechselwirkungen kontaktieren könnten. So enthält z.B. Prp4p in seiner Sequenz sog. WD-

Repeats, die solche Wechselwirkungen vermitteln können, und auch Prp6p, das in der Hefe mit dem U4/U6 snRNP assoziiert ist, enthält Protein-bindende TPR-Motive. Snu13p könnte die U4 snRNA in eine Konformation zwingen, welche die Wechselwirkung mit der U6 snRNA und mit anderen U4/U6 Proteinen begünstigt.

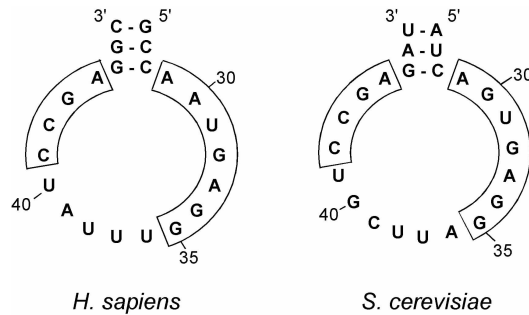


Abb. 68: Das humane 15.5kD Protein bindet phylogenetisch konservierte Nukleotide der U4 snRNA 5'-Haarnadelschleife

Abgebildet sind die 5'-Haarnadelschleifen-Sequenzen der menschlichen und der Hefe-U4 snRNAs. Nukleotid-Positionen sind indiziert. Phylogenetisch konservierte Nukleotide der offenen Schleife, die für die Bindung des humanen 15.5kD Proteins essentiell sind, sind eingrahmt [72].

5.2.2.3 Snu66p, Spp381p und Snu23p

Snu66p, Spp381p und Snu23p wurden zunächst *in vivo* mit einem Affinitätstag (Protein A) versehen, um ihre Assoziation mit snRNPs untersuchen zu können. Immunpräzipitationsanalysen zeigten, daß diese Proteine vergleichsweise schwach mit dem tri-snRNP assoziiert sind. Alle drei Proteine sind am prä-mRNA Spleißen beteiligt, wie entweder durch Immuninhibitions- und Komplementationsstudien *in vitro* (Snu66p; siehe Abb. 42) oder durch Depletion der Proteine *in vivo* (Spp381p und Snu23p; siehe Abb. 43) gezeigt werden konnte. Antikörper, die Snu66-protAp binden, führen *in vitro* zu einer (sterischen) Inhibition der Spleißreaktion, d.h. Snu66p ist im Spleißosom zumindest in räumlicher Nähe zu kritischen Interaktionen positioniert. Die Antikörper könnten durch ihre Bindung an Snu66-protAp auch direkt mit der Funktion von Snu66p im Spleißosom interferieren. Im Einklang mit den Studien von Lybarger und Mitarbeitern [177] führte die Depletion von Spp381p zu einer Spleißinhibition, aber nicht zum Zelltod; das gleiche wurde für Snu23p beobachtet. Da sich der verwendete *GALI*-Promotor aber nicht absolut reprimieren läßt, kann man nicht ausschließen, daß *SNU23* ein essentielles Gen ist.

Die Untersuchungen zur Assoziation von Snu66p, Spp381p und Snu23p mit dem Spleißosom (Abb. 44 und Abb. 45) verdeutlichten, daß diese Proteine ihre Funktionen während der Spleißreaktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten ausüben. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in einem Modell in Abb. 69 zusammengefaßt. Während Snu66p in allen Stadien des voll assemblierten Spleißosoms, inklusive der beiden Spleißreaktionen, nachzuweisen ist, kann Spp381p nicht im aktivierten Spleißosom detektiert werden. Spp381p könnte somit nur an Vorgängen während der Assemblierungsphase des Spleißosoms beteiligt sein, bevor dieses durch die Dislokation der U1 und U4 snRNPs aktiviert wird. Dies stimmt mit den Resultaten von Lybarger und Mitarbeitern [177] überein, die eine teilweise

Redundanz der Funktionen von Prp38p und Spp381p, sowie eine physische Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen nachweisen konnten. Prp38p ist seinerseits essentiell am Prozeß der Dislokation des U4 snRNPs aus dem Spleißosom beteiligt [98]. Somit könnte Spp381p zunächst mit dem tri-snRNP in das Spleißosom eingehen, dann aber gleichzeitig oder zusammen mit dem U4 snRNP das aktivierte Spleißosom verlassen, bevor der erste Schritt der Spleißreaktion katalysiert wird. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß Spp381p aufgrund einer schwachen Assoziation im Laufe der Spleißosomen-Reinigung mit biotinylierter prä-mRNA (Kapitel 4.4.9) verloren geht. Dies ist aber unwahrscheinlich, da sich tri-snRNPs bei der gleichen Salzkonzentration, die auch zur Spleißosomen-Reinigung verwendet wurde, mit Spp381p aus Extrakten kopräzipitieren ließen. Snu23p wiederum ist Teil des aktivierten Spleißosoms. Allerdings konnte keines der Produkte oder Intermediate der Spleißreaktion mit Snu23p kopräzipitiert werden. Snu23p könnte daher im Spleißosom von anderen Proteinen so "bedeckt" sein, daß es für Antikörper unzugänglich ist.

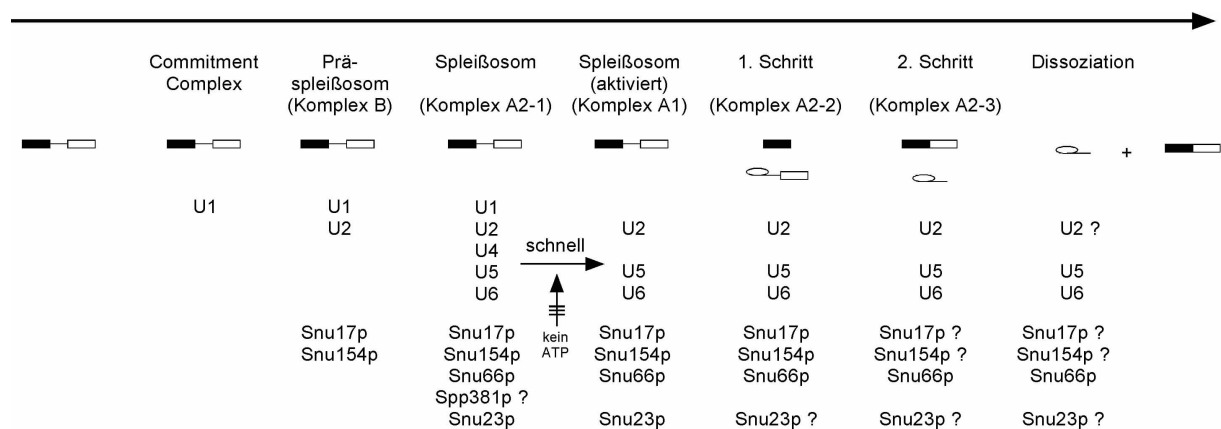


Abb. 69: Sequenzielle Formierung der Spleißkomplexe und Präsenz der hier untersuchten Proteine in diesen Komplexen

Die unterschiedlichen Spleißkomplexe sind so aufgeführt, wie man sie in zeitlicher Abfolge durch native Gelelektrophorese nachweisen kann. Die Nomenklatur für die Komplexe ist die für das Hefe-System verwendete. Die Präsenz von prä-mRNA und Spleißprodukten, der einzelnen snRNPs und der hier untersuchten Proteine in den jeweiligen Komplexen ist angegeben, so wie sie sich aus den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten ableiten läßt. Der Übergang von A2-1 zu A1 ist sehr schnell und kann durch Reduzierung der ATP-Konzentration kinetisch verlangsamt werden (siehe dazu Kapitel 4.4.9).

Das [U4/U6.U5] tri-snRNP ist in Struktur und Funktion evolutionär in Mensch und Hefe viel höher konserviert als das U1 snRNP. Dies spiegelt wider, daß der Prozeß der Katalyse der Spleißreaktion, an denen die Bestandteile des tri-snRNPs maßgeblich beteiligt sind, in beiden Spezies viel besser konserviert ist, als das für die frühen Schritte der Spleißosomassemblierung der Fall ist. Die tri-snRNPs in den beiden Spezies unterscheiden sich nur geringfügig was ihre Proteinkomposition angeht. Nur wenige Proteine, so z.B. das humane U5-27kD Protein mit seiner SR-Domäne oder das Hefe-Protein Spp381p, müssen womöglich als spezifisch für die eine oder andere Spezies angesehen werden. Die snRNAs

der tri-snRNPs in Mensch und Hefe sind evolutionär konserviert und durchlaufen während des Spleißzyklus sehr ähnliche, wenn nicht identische konformationelle Umlagerungen (siehe Einleitung). Diese RNA-Umlagerungen werden weitestgehend von den snRNP-Proteinen und Spleißfaktoren bewerkstelligt und reguliert. Unter diesem Gesichtspunkt ist die generelle evolutionäre Konservierung der tri-snRNP-Proteine zwischen Mensch und Hefe signifikant. Sie legt nahe, daß die Natur der RNA/Protein- und Protein/Protein-Interaktionen in den beiden tri-snRNP-Komplexen, wie auch deren Dynamik während des Spleißzyklus, sehr ähnlich sind.

5.3 Identifizierung und mögliche Funktion eines [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNP-Komplexes

Durch Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, daß Snu66p, Spp381p und Snu23p mit dem tri-snRNP, aber auch mit einem tetrameren Komplex, bestehend aus U2, U4, U5 und U6 snRNPs, assoziiert sind. Dieser tetramere Komplex konnte auch mit Antikörpern gegen die U5- und tri-snRNP-spezifischen Proteine Prp8p und Snu114p, sowie mit den U2-Proteinen Rse1p und Snu17p präzipitiert werden (Kapitel 4.5 und 4.7.2). Über einen tetra-snRNP-Komplex war schon von Raghunathan und Mitarbeitern berichtet worden [110], die das [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNP mit dem Protein Brr2p/Snu246p kopräzipitieren konnten. Dies ist jedoch der einzige Bericht über die Existenz eines tetra-snRNPs in der Hefe. Auch im Humansystem wurde ein ähnlicher Komplex beobachtet [194]. Zwar haben auch andere Arbeitsgruppen mit U2- oder tri-snRNP-spezifischen Hefe-Proteinen eine Kopräzipitation des jeweils anderen Partikels beobachtet [86, 87]. Diese Kopräzipitationen wurden jedoch als unspezifisch angesehen, da sie nur bei vergleichsweise geringen Salzkonzentrationen zu beobachten sind. Möglicherweise führt aber auch die Verwendung verschiedener Affinitätstags bzw. Antiseren zu unterschiedlichen Ergebnissen (so fanden Lybarger und Mitarbeiter keine Kopräzipitation von U2 snRNPs mit Spp381p [177]).

Das [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNP ist ein dynamischer Komplex, der bei Inkubation mit ATP in seine konstituierenden snRNP-Untereinheiten zerfällt. Dies konnte am isolierten Komplex genau untersucht werden (Abb. 48). Über die Dissoziation im Extrakt läßt sich nur die Aussage machen, daß Snu66p, Spp381p und Snu23p von allen vier snRNPs abdissoziieren (Abb. 47). Die Dissoziation ist jedoch reversibel und die Depletion von ATP führt zu einer Reassoziierung der hier untersuchten Proteine mit dem tetra-snRNP (zumindest im Extrakt). Auch biochemisch isolierte [U4/U6.U5] tri-snRNPs zerfielen (in Abwesenheit des U2 snRNPs) in gleicher Weise (Abb. 49). Die Bedeutung dieses Dissoziationsverhaltens ist noch nicht klar. In der Literatur finden sich widersprüchliche Aussagen über den Einfluß von ATP

auf die Assoziation von snRNPs im Gesamtzellextrakt. Insbesondere sind die Beobachtungen im Vergleich von Hefe- und Humansystem nicht konsistent: Einmal wird über eine Dissoziation von tri-snRNPs bei ATP-Behandlung berichtet [14], in anderen Fällen wurde eine ATP-stimulierte Bildung des tri-snRNPs beobachtet [195]. Die Beobachtungen unterscheiden sich auch je nach den experimentellen Bedingungen (z.B. Glyzeringradienten-Zentrifugation im Gegensatz zur Gelelektrophorese der analysierten Komplexe im nativen Zustand). Womöglich könnten weitere Studien am tetra-snRNP hier für Klarheit sorgen.

Raghunathan und Mitarbeiter [110] konnten zeigen, daß die von ihnen beobachtete ATP-induzierte Dissoziation des tetra-snRNPs durch die Aktivität der ATP-abhängigen RNA-Helikase Brr2p/Snu246p bewirkt wird. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine ATP-induzierte Dissoziation der U4 und U6 snRNAs beobachtet, was für die Aktivität einer RNA-Helikase spricht. Wie durch die Inkubation des isolierten Partikels mit verschiedenen Nukleosidtriphosphaten ermittelt werden konnte (nicht gezeigt), hat die mutmaßliche Helikase eine Spezifität für ATP und dATP. Die Inkubation des tetra-snRNPs mit CTP, GTP, UTP und dem nicht hydrolysierbaren ATP-Analogon ATP γ S hatte dagegen keinen vergleichbaren Effekt. Diese Spezifität der Helikase deutet indirekt auf Brr2p/Snu246p hin, da sein humanes Ortholog, das U5-200kD Protein, eine sehr ähnliche Spezifität für Nukleosidtriphosphate hat [196].

Welche Funktion könnte das tetra-snRNP ausüben ? Die Bildung dieses Partikels könnte verschiedene Ursachen haben. Während der Phase der Rekrutierung des tri-snRNPs durch das Prä-Spleißosom, aber auch im aktiven Spleißosom, müssen U2-Proteine mit Bestandteilen der U5 und U6 snRNPs interagieren. Diese Wechselwirkungen könnten auch in Abwesenheit von prä-mRNA bestehen, auch wenn sie durch die Bindung des Spleißsubstrates vielleicht deutlich verstärkt werden. Konsistent damit konnte im Humansystem in Abwesenheit von prä-mRNA eine UV-induzierte Quervernetzung der U2, U4 und U6 snRNAs beobachtet werden [197]. Wechselwirkungen zwischen dem U2 snRNP und dem tri-snRNP "außerhalb" des funktionellen Spleißosoms müssen vermutlich aufgelöst werden, damit die snRNP-Untereinheiten des tetra-snRNPs der Spleißreaktion zur Verfügung stehen. Die RNA-Helikase Brr2p/Snu246p könnte neben ihrer essentiellen Aufgabe, die U4/U6 snRNA-Helices im Spleißosom zu entwinden, auch eine Funktion bei der Auflösung der Wechselwirkungen im tetra-snRNP ausüben. Möglicherweise ist in diesem Komplex, zusätzlich zu den U4/U6-Helices, eine U2/U6-Helix ausgebildet, wie sie z.T. auch im aktiven Spleißosom gebildet wird (die sog. U2/U6 Helix II; vgl. die Interaktion "f" in Abb. 4 und [3]). Brr2p/Snu246p könnte diese Helix auflösen, um U2 und tri-snRNPs im tetra-snRNP zu dissoziieren. Diese Annahme steht im Einklang mit den Ergebnissen von Xu und Mitarbeitern, die eine Stimulation der ATPase-Aktivität von immunpräzipitiertem Brr2p/Snu246p durch Zugabe von basengepaarten U2/U6 snRNAs feststellen konnten [94]. Brr2p/Snu246p könnte also nicht nur

allein die U4/U6-Helices entwinden, sondern auch an der Auflösung der U2/U6-Helices (bei der Auflösung des postspleißosomalen Komplexes) beteiligt sein. Konsistent mit dieser Annahme enthält Brr2p/Snu246p zwei verschiedene DEXD/H-RNA-Helikase-Domänen. Eine dieser Domänen könnte spezifisch für U4/U6-, die andere spezifisch für die U2/U6-Helices sein. Tatsächlich wurde kürzlich gezeigt, daß nur die N-terminale DEXD/H-Domäne von Brr2p/Snu246p für die Entwindung der U4/U6-Helices verantwortlich ist [198]. Das tetra-snRNP könnte in Zukunft womöglich als ein einfach isolierbares Modellpartikel zum Studium der dynamischen RNA-Konformationsänderungen dienen, die im Spleißosom bei seiner Aktivierung und nach der Beendigung der Spleißreaktion im postspleißosomalen Komplex stattfinden.

5.4 Charakterisierung des freien U5 snRNPs der Hefe und mögliche Funktion des U5 snRNP-Proteins Aar2p

Im Rahmen der Sequenzierung der mit dem U1 snRNP koisolierten Proteine konnte ein Protein identifiziert werden (Aar2p), das spezifisch nur mit dem freien U5 snRNP assoziiert ist. In einer Glyzeringradienten-Zentrifugation von Hefe-Gesamtzell-Extrakt kosedimentierte Aar2p zusammen mit dem freien U5 snRNP, das einen Sedimentationskoeffizienten von ca. 17S hat (Abb. 52). Aar2p ist nicht Teil des [U4/U6.U5] tri-snRNPs, da es weder in biochemisch isolierten tri-snRNPs identifiziert wurde, noch ließen sich die U4 und U6 snRNAs mit spezifischen Antikörpern gegen Aar2p kopräzipitieren (Abb. 50). Ein Hefestamm wurde erzeugt, der Aar2p mit einem zusätzlichen Dekahistidin-Peptid exprimiert. Aus Extrakten dieses Stammes konnte das freie U5 snRNP isoliert werden, das nur Aar2p, Prp8p, Snu114p und die Sm Proteine enthielt. Das freie U5 snRNP der Hefe ist somit wesentlich einfacher aufgebaut, als sein menschliches Gegenstück, das insgesamt zehn Partikel-spezifische Proteine enthält. Diese stellen die Mehrzahl der Proteine dar, die sich auch im menschlichen tri-snRNP finden. Zwar sind die Orthologen dieser menschlichen tri-snRNP-Proteine auch in der Hefe mit dem tri-snRNP assoziiert, die meisten von ihnen dissoziieren jedoch von allen snRNPs ab, wenn das Hefe-tri-snRNP höheren Salzkonzentrationen ausgesetzt wird (Abb. 59 und Kapitel 5.2). Der Vergleich der Strukturen humaner U5 snRNPs mit denen der Hefe (Abb. 58) zeigt ebenfalls die Unterschiede auf: Das humane U5 snRNP ist etwas größer und hat eine andere Struktur als das Hefe-Partikel, was mit der Assoziation zusätzlicher Proteine im menschlichen U5 snRNP im Einklang steht. Die Struktur des humanen U5 snRNP läßt sich gut mit einem großen Teil der Struktur des humanen tri-snRNPs zur Deckung bringen und die menschlichen U4/U6 snRNPs bilden eindeutig die zusätzliche Domäne des humanen tri-snRNPs (vgl. Abb. 7). Dagegen ist die Struktur des

Hefe-U5 snRNPs nicht so einfach in der Struktur des Hefe-tri-snRNPs wiederzufinden, da hier außer den U4/U6 snRNPs eben noch zahlreiche weitere Proteine an das vollständige tri-snRNP binden (vgl. Abb. 37). Eine interessante Gemeinsamkeit bei den U5 snRNPs in Mensch und Hefe ist jedoch, daß auch das humane U5 snRNP ein Protein enthält (U5-52kD), welches nicht im voll assemblierten tri-snRNP zu finden ist. Aar2p könnte somit ein funktionelles Gegenstück zum humanen U5-52kD Protein darstellen, obwohl die Sequenzanalyse der beiden Proteine keine signifikante Ähnlichkeit aufzeigt.

Interessanterweise wurde das freie U5 snRNP in äquimolaren Mengen zusammen mit dem U1 snRNP aufgereinigt. Dies deutet auf eine spezifische Komplexbildung zwischen den U1 und U5 snRNPs hin, wie sie auch schon bei der Isolierung des U1 snRNPs beobachtet worden war. Es liegt nahe anzunehmen, daß hier eine spezifische Wechselwirkung zwischen U1- und U5-Proteinen besteht. Ein U1 snRNP-Protein, das Protein/Protein-Wechselwirkungen eingehen kann ist Prp40p. Dieses Protein enthält zwei WW-Domänen, welche Polyprolin-Peptide binden können. Das U5 snRNP-Protein Prp8p enthält solche Polyprolin-Peptide in seinem N-Terminus. Tatsächlich konnte das U1 snRNP aus Extrakten spezifisch mit einem Fusionsprotein aus GST und den N-terminalen 88 Aminosäuren des Prp8p Proteins koprizipitiert werden (nicht gezeigt). Eine Wechselwirkung zwischen Prp40p und Prp8p wurde auch von [118] gezeigt. Der mutmaßliche U1/U5-Komplex, der sich chromatographisch reinigen ließ, konnte hier jedoch durch Glyzeringradienten-Zentrifugation des Isolates nicht nachgewiesen werden. Die U1/U5-Wechselwirkung könnte z.B. durch Scherkräfte oder Verdünnungseffekte bei der Zentrifugation zerstört werden. Dies würde die breite Sedimentation von U5 und U1 snRNPs im Gradienten erklären (Abb. 56): Die U1/U5-Partikel könnten erst im Laufe der Sedimentation zerfallen und daher auch in Fraktionen verbleiben, die nicht ihrem Sedimentationskoeffizienten als Monopartikel entsprechen.

Das U5 snRNP konnte durch Gradienten-Zentrifugation in Puffer mit 50 mM Salz vollständig von den U1 snRNPs gereinigt werden (Abb. 57). Das gereinigte Partikel wurde für die oben beschriebenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen verwendet. Da dieses Partikel relativ einfach aufgebaut ist und außer den Sm Proteinen nur drei spezifische Proteine enthält, sollte es sich insbesondere für die Kryo-Elektronenmikroskopie zur Aufklärung seiner 3D-Struktur, wie auch zur detaillierten Analyse der Protein/RNA-Wechselwirkungen in diesem Partikel eignen. Hierbei gewonnene Ergebnisse sollten wegen der einfachen strukturellen Organisation auch vergleichsweise leicht zu interpretieren sein. Weil neben Prp8p und Snu114p nur Aar2p und die Sm Proteine im U5 snRNP vorhanden sind, ist es wahrscheinlich, daß Snu114p und Prp8p direkt in Kontakt mit der U5 snRNA stehen. Tatsächlich konnten diese beiden Proteine an mehreren Positionen mit der U5 snRNA quervernetzt werden [74]. Man kann daher annehmen, daß das freie U5 snRNP ein strukturelles Grundgerüst des tri-snRNPs darstellt, denn bislang konnte für kein anderes tri-snRNP-Protein eine spezifische

Bindung der U5 snRNA gezeigt werden. Die restlichen tri-snRNP-Proteine und das U4/U6 snRNP assemblieren vermutlich durch Protein/Protein-Wechselwirkungen mit dem freien U5 snRNP, um das vollständige tri-snRNP zu formieren. Da Aar2p nicht im tri-snRNP vorhanden ist, muß es im Laufe dieses Prozesses vom U5 snRNP abdissoziieren. Dies schien zunächst ein Hinweis auf eine Funktion von Aar2p in der Assemblierung und Reifung des [U4/U6.U5] tri-snRNPs sein.

Um zu untersuchen, ob Aar2p für die Bildung des tri-snRNPs notwendig ist, wurden weitere Experimente durchgeführt (nicht gezeigt). Dazu wurde zunächst ein Aar2p-depletierter Extrakt hergestellt. Die Zusammensetzung und das Sedimentationsverhalten der snRNPs in diesem Extrakt wurde durch Glyzeringradienten-Zentrifugation untersucht und mit einem Aar2p-haltigen Extrakt verglichen. Weder zeigten die U5 snRNPs oder tri-snRNPs im Aar2p-depletierten Extrakt ein aberrantes Sedimentationsverhalten, noch unterschieden sich ihre relativen Mengen signifikant von denen im Aar2p-haltigen Extrakt. Aar2p scheint also nicht an der Bildung des tri-snRNPs beteiligt zu sein. Ebenso ist es nicht notwendig, um das freie U5 snRNP zu stabilisieren, denn das 15S-U5 snRNP kann auch durch Salzbehandlung aus dem [U4/U6.U5] tri-snRNP dargestellt werden, der Aar2p nicht enthält (Abb. 59). Möglicherweise ist Aar2p stattdessen für die Auflösung des postspleißosomalen Komplexes, der aus den U2, U5 und U6 snRNPs und dem Intron besteht, bzw. für das Recycling des tri-snRNPs nach einer durchlaufenen Spleißreaktion verantwortlich. Dies wurde durch Spleiß-Experimente *in vitro* untersucht (nicht gezeigt). Die (vorläufigen) Ergebnisse dieser Experimente sollen hier nur kurz diskutiert werden. Die Spleißaktivität eines von Aar2p depletierten Extraktes war zunächst nicht von der eines Wildtyp-Extraktes zu unterscheiden. Um jedoch eine mögliche Beteiligung von Aar2p am Recycling des tri-snRNPs zu untersuchen, mußte gewährleistet sein, daß mehrere Runden der Spleißreaktion durchlaufen werden. Die Reaktionsansätze wurden daher zunächst mit einem Überschuß an unmarkierter prä-mRNA vorinkubiert, so daß alle vorhandenen tri-snRNPs bzw. Spleißosomen in Spleißreaktionen involviert waren. Erst dann wurde die radioaktiv markierte prä-mRNA zugegeben. Spleißen dieser RNA sollte sich nur dann beobachten lassen, wenn effizientes Recycling des tri-snRNPs stattfindet. Der depletierte Extrakt spleißte die markierte RNA bis zu einem ca. 15-fachen Überschuß an unmarkierter prä-mRNA. Im Gegensatz dazu wurde die markierte prä-mRNA im Aar2p-haltigen Extrakt bis zu einem 50-fachen Überschuß an unmarkierter prä-mRNA gespleißt. Der negative Effekt wurde spezifisch durch die Abwesenheit von Aar2p ausgelöst, da die Zugabe von exogenem Aar2p zu dem depletierten Extrakt seine Spleißaktivität bis auf das Niveau des Wildtyp-Extraktes erhöhte. Aar2p könnte also dafür verantwortlich sein, daß U5 snRNPs bzw. tri-snRNPs mehrfach im Spleißzyklus wiederverwendet werden können, ähnlich wie Prp24p bei der Neubildung des U4/U6 snRNPs assistiert [19]. Dies muß aber noch näher untersucht werden. Wenn Aar2p die Neubildung des

tri-snRNPs ermöglicht, so könnte es mit dem U5 snRNP bereits im postspleißosomalen Komplex assoziieren. Man könnte z.B. überprüfen, ob mit Aar2p aus einer Spleißreaktion *in vitro* spezifisch das gespleißte Intron kopräzipitiert wird.

5.5 Identifizierung und Charakterisierung neuer U2 snRNP-Proteine

Bei der Analyse der Proteine des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Isolates wurden, aufgrund der Präsenz geringer Mengen an U2 snRNPs, auch drei U2 snRNP-Proteine identifiziert: Das bereits bekannte Hsh49p Protein und zwei neue U2-spezifische Proteine, Rse1p und Snu17p. Rse1p ist das Orthologe des menschlichen U2 snRNP-Proteins SAP130, einer Untereinheit des tetrameren Protein-Spleißfaktors SF3b (persönliche Mitteilung Dr. R. Reed). Rse1p wurde unabhängig auch im Labor von Dr. B. Séraphin (EMBL, Heidelberg) in partiell gereinigten U2 snRNPs identifiziert [182].

Rse1p und SAP130 haben eine beträchtliche Sequenzhomologie mit der 160 kDa Untereinheit des an der Polyadenylierung beteiligten cleavage and polyadenylation specificity factor, CPSF (siehe Abb. 60). Darüberhinaus teilen sie auch Homologie mit einer evolutionär konservierten Gruppe von Proteinen, die in Reparaturprozessen an UV-Licht-geschädigter DNA involviert sind (nicht gezeigt). Dieses deutet auf eine Abstammung dieser drei Proteinfamilien von einem gemeinsamen Vorläuferprotein hin [182]. Alle Proteine haben gemeinsam, daß sie an Prozessen beteiligt sind, die die Bindung und Prozessierung von Nukleinsäuren beinhalten. Für den CPSF-Komplex ist eine direkte Wechselwirkung mit dem AAUAAA-Polyadenylierungssignal bekannt und ein direkter Kontakt von CPSF160 mit der mRNA konnte nachgewiesen werden [199]. Dagegen konnte das menschliche SAP130, im Gegensatz zu allen anderen SF3b-Untereinheiten, nicht mit dem Spleißsubstrat quervernetzt werden [59]. Dies schließt aber nicht aus, daß Rse1p bzw. SAP130 womöglich direkt die U2 snRNA binden.

Snu17p enthält eine RNA-Bindungsdomäne, die etwa 50% seiner Sequenz einnimmt. Man findet daher bei einer Homologiesuche mit der Snu17p-Sequenz in Protein- und EST-Datenbanken zahlreiche menschliche Sequenzen, die RBDs enthalten. Die von einem bestimmten menschlichen EST abgeleitete Proteinsequenz weist jedoch eine besonders hohe Ähnlichkeit zu Snu17p auf, die sich auch über die RBD-Domäne hinaus erstreckt (Abb. 61). Es ist daher möglich, daß ein zu Snu17p orthologes Protein des Menschen existiert.

Für beide Proteine, Rse1p und Snu17p, konnte durch Immunpräzipitation eine Assoziation mit dem U2 snRNP demonstriert werden. Snu17p bindet deutlich stabiler an das U2 snRNP als Rse1p (Abb. 62). Darüberhinaus wurden mit beiden Proteinen geringe Mengen

an U5 und U6, sowie noch geringere Mengen an U4 snRNA kopräzipitiert. Womöglich werden hier [U2.U4/U6.U5] tetra-snRNPs mit dem U2 snRNP kopräzipitiert, so wie sich auch eine Kopräzipitation des tetra-snRNPs mit tri-snRNP-Proteinen beobachten ließ (vergl. Abb. 38). Für Rse1p und Snu17p konnte eine Assoziation mit dem Spleißosom nachgewiesen werden, da außer der prä-mRNA auch das Intron-Exon2-Intermediat mit beiden Proteinen aus *in vitro* Spleißreaktionsmischungen kopräzipitiert wurde (Abb. 63). Die prä-mRNA wurde hier wesentlich effizienter präzipitiert, als dies bei den tri-snRNP-Proteinen Snu66p und Snu23p der Fall war (vgl. Abb. 44). Es ist wahrscheinlich, daß mit den beiden U2 snRNP-Proteinen außer dem Spleißosom auch das Prä-Spleißosom präzipitiert wurde. Dieses wird vermutlich in größeren Mengen als das Spleißosom gebildet (und somit präzipitiert), da im Extrakt, im Vergleich zu tri-snRNPs, 5- bis 10-mal mehr U1 und U2 snRNPs vorhanden sind. Die spezifische Kopräzipitation des Intron-Exon2-Intermediats mit Rse1p und Snu17p belegt eine Assoziation dieser Proteine mit dem Spleißosom, zumindest bis nach dem ersten katalytischen Schritt (siehe Abb. 69). Das gespleißte Intron wird dagegen nicht mit den beiden Proteinen kopräzipitiert. Dies könnte bedeuten, daß das U2 snRNP nach der Beendigung der Spleißreaktion nicht Bestandteil des postspleißosomalen Komplexes ist und somit nicht mit dem Intron assoziiert bleibt, wie das zunächst für das U5 snRNP der Fall ist (siehe z.B. [200]). Dies ließe sich überprüfen, wenn man die Auflösung des postspleißosomalen Komplexes inhibieren könnte. Ließe sich das Intron auch dann nicht mit den U2 snRNP-Proteinen präzipitieren, so wäre das ein Hinweis, daß das U2 snRNP nicht mehr Teil des Postspleißosoms ist. Kürzlich wurde eine Temperatur-sensitive Mutation in der RNA-Helikase Prp43p beschrieben, die die Auflösung dieses Komplexes inhibiert [115], und sich daher womöglich für das skizzierte Experiment eignet.

Durch Gen-Deletion konnte gezeigt werden, daß *SNU17* kein essentielles Gen ist und daß sein Fehlen lediglich einen Temperatur-sensitiven Wachstumsphänotypen erzeugt (Abb. 65). Die Untersuchung der *in vitro*-Spleißaktivität des *snu17Δ*-Extraktes bestätigte die *in vivo*-Befunde, da der Extrakt im Vergleich zum Wildtyp eine starke, temperaturabhängige Hemmung aufwies (Abb. 66). Die Hemmung der Spleißaktivität ließ sich durch Zugabe von rekombinantem GST-Snu17p aufheben (Abb. 67). Da sich die Zugabe von GST-Snu17p (bei höheren Temperaturen) auch auf die Spleißaktivität eines Wildtyp-Extraktes positiv auswirkte, erscheint es möglich, daß Snu17p eine stabilisierende Funktion im Spleißosom innehat, die unter Bedingungen erhöhter thermischer Mobilität im Spleißosom benötigt wird (in etwa wie bei einem Hitzeschockprotein). Die genaue Funktion von Snu17p im prä-mRNA Spleißen ist noch nicht geklärt. Insbesondere ist nicht klar, ob Snu17p seine Funktion bei der Assemblierung des Prä-Spleißosoms, des Spleißosoms oder bei dessen Aktivierung ausübt. Womöglich hat Snu17p eine Funktion erst beim ersten katalytischen Schritt der Spleiß-

reaktion. Daher wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob sich die Abwesenheit von Snu17p auf die Bildung des aktiven Spleißosoms auswirkt (nicht gezeigt). Spleißosomen, die auf biotinylierter prä-mRNA assemblieren (vgl. Kapitel 4.4.9), wurden aus Wildtyp- oder *snu17Δ*-Extrakten präzipitiert und ihre Komposition verglichen. Aus dem *snu17Δ*-Extrakt wurde, im Vergleich zum Wildtyp, eine geringere Menge von U5 und U6 snRNPs mit der prä-mRNA kopräzipitiert. Dagegen wurden deutlich mehr U5 und U6 snRNPs an das biotinylierte Substrat gebunden, wenn gleichzeitig rekombinantes GST-Snu17p zugegen war. Dies deutet darauf hin, daß Snu17p eine helfende Funktion bei der Rekrutierung des tri-snRNPs durch das Prä-Spleißosom ausüben könnte. UV-Quervernetzungs-Experimente hatten ergeben, daß Snu17p in einer *in vitro*-Spleißreaktion direkt mit der prä-mRNA assoziiert ist (Abb. 64). Möglicherweise induziert Snu17p durch seine Bindung an die prä-mRNA eine Konformation, die die Assoziation des tri-snRNPs mit dem Prä-Spleißosom stabilisiert. Diese Assoziation wird durch das Fehlen von Snu17p anscheinend nur bei höheren Temperaturen gestört, womöglich, weil die stärkere thermische Beweglichkeit der daran beteiligten Moleküle bei höheren Temperaturen durch die Funktion von Snu17p unterdrückt wird.

5.6 Folgerungen und Ausblick

Durch die Verwendung eines biochemischen Ansatzes (im Gegensatz zum klassischen molekulargenetischen) konnten in dieser Arbeit die Proteinkompositionen der U1 snRNPs und der [U4/U6.U5] tri-snRNPs der Hefe umfassend bestimmt werden. Insgesamt sind, nach dem heutigen Wissensstand, 45 verschiedenen Proteine mit diesen UsnRNP-Partikeln assoziiert. Von diesen konnten nur zwei bereits bekannte tri-snRNP-Proteine nicht durch massenspektrometrische Peptidsequenzierung nachgewiesen werden, da sie vermutlich als schwach assoziierte snRNP-Proteine bei der Aufreinigung des Partikels verloren gingen. Dies verdeutlicht, daß die hier entwickelten biochemischen Methoden, trotz der geringen isolierbaren Mengen, sehr gut zur schnellen Identifizierung von UsnRNP-assoziierten Proteinen der Hefe geeignet sind. Dies wurde erst durch die jüngste Entwicklung sehr empfindlicher massenspektrometrischer Methoden zur Peptidsequenzierung ermöglicht. Die zweite wichtige Voraussetzung für diese Arbeit war die Verfügbarkeit der gesamten Genomsequenz der Hefe, da die identifizierten Peptide nur so schnell einem bestimmten Gen zugeordnet werden konnten.

Mit der Kenntnis des Genoms kann man funktionelle Zusammenhänge direkt im Proteom des entsprechenden Organismus analysieren. Dies wurde hier beispielhaft an den UsnRNPs gezeigt. Die hier analysierten Proteine stehen in einem direkten funktionellen Zusammenhang, da sie als Komponenten wohldefinierter, funktioneller Multiproteinkomplexe aufgereinigt wurden. In den meisten Fällen genügt die Kenntnis einer einzigen Peptidsequenz,

um sofort die gesamte Proteinsequenz aus der Datenbank zu erhalten. Der langwierige Prozeß einer cDNA-Klonierung entfällt also. Die Kombination der schnellen und empfindlichen massenspektrometrischen Sequenzierungsmethoden mit der zunehmenden Verfügbarkeit sequenzierter Genome, kann als wegweisend angesehen werden. Diese Art der Proteomanalyse wird daher auch in höheren Organismen, nicht zuletzt beim Menschen, ihre Anwendung finden. Prinzipiell sollte die Aufklärung aller Arten von zellulären Prozessen, an denen Multiproteinkomplexe beteiligt sind, mit diesen Methoden möglich sein.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde die Grundlage für weitreichende funktionelle Studien an mehreren neu identifizierten snRNP-Proteinen geschaffen. Für einige ausgewählte Proteine wurde bereits mit einer funktionellen Charakterisierung begonnen. Diese funktionellen Studien werden fortgeführt werden und weitere Aufschlüsse über die Funktionen der einzelnen Proteine im Spleißprozeß erbringen. Die hier etablierten Methoden zur Aufreinigung von snRNPs sollten sich auch gezielt auf die Isolierung des U2 snRNPs anwenden lassen. Weit interessanter dürfte es jedoch sein, das gesamte Spleißosom zu isolieren. So sollten sich weitere Faktoren identifizieren lassen, die nicht mit den freien snRNPs, jedoch mit dem Spleißosom assoziiert sind. Ein solcher Ansatz ist im Human-System bereits unternommen worden [201] und führte zur Identifikation einer ganzen Reihe unbekannter Proteine, die jetzt näher untersucht werden können. Auch in der Hefe ist hier die Entdeckung weiterer nicht-usnRNP Spleißfaktoren zu erwarten. Das Hefe-System bietet hierbei den Vorteil einer idealen Kombinierbarkeit von Molekulargenetik und Biochemie, um wohldefinierte Spleißkomplexe (also Intermediate des Spleißzyklus) zu isolieren. Hier lassen sich bestimmte Mutationen in verschiedenen Spleißfaktoren nutzen, um die Spleißosom-Assemblierung noch in der Zelle an einem ganz bestimmten Teilschritt zu blockieren. Durch die Verwendung der im Hefe-System sehr ausgereiften Molekulargenetischen Methoden lassen sich die Funktionen der am prä-mRNA Spleißen beteiligten Proteine detailliert aufklären. Dies wird in Zukunft zu einem umfassenderen Verständnis der Abläufe in der komplexen Spleißmaschinerie führen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Moore, M.J., C.C. Query und P.A. Sharp, *Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosome*, in *The RNA world*, R.F. Gesteland und J.F. Atkins, Editors. 1993, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York. S. 303-357.
2. Will, C.L., P. Fabrizio und R. Lührmann, *Nuclear Pre-mRNA Splicing*, in *Nucleic Acids and Molecular Biology*, F. Eckstein und D.M.J. Lilley, Editors. 1995, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. S. 342-372.
3. Staley, J.P. und C. Guthrie, *Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things*. Cell, 1998. **92**(3): S. 315-26.
4. Burge, C.B., T. Tuschl und P.A. Sharp, *Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosome*, in *The RNA world II*, R.F. Gesteland, T.R. Chech und J.F. Atkins, Editors. 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York. S. 525-560.
5. Mount, S.M., *et al.*, *The U1 small nuclear RNA-protein complex selectively binds a 5' splice site in vitro*. Cell, 1983. **33**(2): S. 509-18.
6. Rosbash, M. und B. Séraphin, *Who's on first? The U1 snRNP-5' splice site interaction and splicing*. Trends Biochem Sci, 1991. **16**(5): S. 187-90.
7. Parker, R., P.G. Siliciano und C. Guthrie, *Recognition of the TACTAAC box during mRNA splicing in yeast involves base pairing to the U2-like snRNA*. Cell, 1987. **49**(2): S. 229-39.
8. Nilsen, T.W., *RNA-RNA interactions in nuclear pre-mRNA splicing*, in *RNA structure and function*, R.W. Simons und M. Grunberg-Manago, Editors. 1998, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York. S. 279-307.
9. Moore, M.J. und P.A. Sharp, *Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing*. Nature, 1993. **365**(6444): S. 364-8.
10. Michel, F. und J.L. Ferat, *Structure and activities of group II introns*. Annu. Rev. Biochem., 1995. **64**: S. 435-461.
11. Weiner, A.M., *mRNA splicing and autocatalytic introns: distant cousins or the products of chemical determinism?* Cell, 1993. **72**(2): S. 161-4.
12. Guthrie, C., *Messenger RNA splicing in yeast: clues to why the spliceosome is a ribonucleoprotein*. Science, 1991. **253**(5016): S. 157-63.
13. Rymond, B.C. und M. Rosbash, *Yeast pre-mRNA splicing*, in *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, E.W. Jones, J.R. Pringle und J.R. Broach, Editors. 1992, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York. S. 143-192.
14. Cheng, S.C. und J. Abelson, *Spliceosome assembly in yeast*. Genes Dev., 1987. **1**(9): S. 1014-27.
15. Zhang, D. und M. Rosbash, *Identification of eight proteins that cross-link to pre-mRNA in the yeast commitment complex*. Genes Dev., 1999. **13**: S. 581-592.
16. Séraphin, B. und M. Rosbash, *Identification of functional U1 snRNA-pre-mRNA complexes committed to spliceosome assembly and splicing*. Cell, 1989. **59**(2): S. 349-58.
17. Konarska, M.M. und P.A. Sharp, *Interactions between small nuclear ribonucleoprotein particles in formation of spliceosomes*. Cell, 1987. **49**(6): S. 763-74.
18. Brow, D.A. und C. Guthrie, *Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals*. Nature, 1988. **334**(6179): S. 213-8.
19. Raghunathan, P.L. und C. Guthrie, *A spliceosomal recycling factor that reanneals U4 and U6 small nuclear ribonucleoprotein particles*. Science, 1998. **279**(5352): S. 857-60.
20. Chanfreau, G., *et al.*, *Alternative 3'-end processing of U5 snRNA by RNase III*. Genes Dev, 1997. **11**(20): S. 2741-51.
21. Mattaj, I.W., *Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding*. Cell, 1986. **46**: S. 905-911.

22. Baserga, S.J. und J.A. Steitz, *The diverse world of small ribonucleoproteins*, in *The RNA World*, R.F. Getsland und J.F. Atkins, Editors. 1993, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York. S. 359-381.
23. Siliciano, P.G., W.J. Kivens und C. Guthrie, *More than half of yeast U1 snRNA is dispensable for growth*. Nucleic Acids Res., 1991. **19**(23): S. 6367-72.
24. Igel, A.H. und M. Ares, Jr., *Internal sequences that distinguish yeast from metazoan U2 snRNA are unnecessary for pre-mRNA splicing*. Nature, 1988. **334**(6181): S. 450-3.
25. Zavanelli, M.I., et al., *Mutations in an essential U2 small nuclear RNA structure cause cold-sensitive U2 small nuclear ribonucleoprotein function by favoring competing alternative U2 RNA structures*. Mol. Cell. Biol., 1994. **14**: S. 1689-1697.
26. Yean, S.-L. und R.-J. Lin, *U4 small nuclear RNA dissociates from a yeast spliceosome and does not participate in the subsequent splicing reaction*. Mol. Cell. Biol., 1991. **11**(5571-5577).
27. Newman, A.J., *The role of U5 snRNP in pre-mRNA splicing*. EMBO J., 1997. **16**(19): S. 5797-800.
28. O'Keefe, R.T., C. Norman und A.J. Newman, *The invariant U5 snRNA loop I sequence is dispensable for the first catalytic step of pre-mRNA splicing in yeast*. Cell, 1996. **86**: S. 679-689.
29. Ségault, V., et al., *Conserved loop I of U5 small nuclear RNA is dispensable for both catalytic steps of pre-mRNA splicing in HeLa nuclear extracts*. Mol. Cell. Biol., 1999. **19**(4): S. 2782-2790.
30. Umen, J.G. und C. Guthrie, *The second catalytic step of pre-mRNA splicing*. RNA, 1995. **1**(9): S. 869-85.
31. Hinterberger, M., I. Pettersson und J.A. Steitz, *Isolation of small nuclear ribonucleoproteins containing U1, U2, U4, U5 and U6 RNAs*. J. Biol. Chem., 1983. **258**(4): S. 2604-2613.
32. Bennett, M., et al., *Protein components specifically associated with prespliceosome and spliceosome complexes*. Genes Dev., 1992. **6**(10): S. 1986-2000.
33. Bochnig, P., et al., *A monoclonal antibody against 2,2,7-trimethylguanosine that reacts with intact, class U, small nuclear ribonucleoproteins as well as with 7- methylguanosine-capped RNAs*. Eur J Biochem, 1987. **168**(2): S. 461-7.
34. Behrens, S.E. und R. Lührmann, *Immunoaffinity purification of a [U4/U6.U5] tri-snRNP from human cells*. Genes Dev., 1991. **5**(8): S. 1439-52.
35. Lustig, A.J., R.J. Lin und J. Abelson, *The yeast RNA gene products are essential for mRNA splicing in vitro*. Cell, 1986. **47**(6): S. 953-63.
36. Vijayraghavan, U., M. Company und J. Abelson, *Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev., 1989. **3**(8): S. 1206-16.
37. Stutz, F., J. Tang und M. Rosbash, *Use of synthetic lethal/enhancer screening methods to identify snRNA:protein and protein:protein interactions in the yeast spliceosome*, in *RNA:protein interactions, a practical approach*, C.W.J. Smith, Editor. 1998, Oxford University Press: Oxford. S. 161-82.
38. Fabrizio, P., et al., *An evolutionarily conserved U5 snRNP-specific protein is a GTP-binding factor closely related to the ribosomal translocase EF-2*. EMBO J., 1997. **16**(13): S. 4092-106.
39. Fromont-Racine, M., J.C. Rain und P. Legrain, *Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens*. Nat. Genet., 1997. **16**: S. 277-82.
40. Raker, V.A., G. Plessel und R. Lührmann, *The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro*. EMBO J., 1996. **15**(9): S. 2256-69.
41. Kambach, C., et al., *Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs*. Cell, 1999. **96**(3): S. 375-87.
42. Fury, M.G., et al., *Multiple protein: protein interactions between the snRNP common core proteins*. Exp. Cell Res., 1997. **237**(1): S. 63-9.
43. Camasses, A., et al., *Interactions within the yeast Sm core complex: from proteins to amino acids*. Mol. Cell. Biol., 1998. **18**(4): S. 1956-66.
44. Surowy, C.S., et al., *Direct, sequence-specific binding of the human U1-70k ribonucleoprotein antigen protein to loop I of U1 small nuclear RNA*. Mol. Cell. Biol., 1989. **9**: S. 4179-4186.
45. Query, C.C., R.C. Bently und D.J. Keene, *A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein*. Cell, 1989. **57**: S. 89-101.

46. Nagai, K., *et al.*, *Crystal structure of the U1A spliceosomal protein complexed with its cognate RNA hairpin*. Nucleic Acids Symp Ser, 1995. **34**: S. 1-2.
47. Nelissen, R.L., *et al.*, *The association of the U1-specific 70K and C proteins with U1 snRNPs is mediated in part by common U snRNP proteins*. EMBO J., 1994. **13**(17): S. 4113-25.
48. Lührmann, R., B. Kastner und M. Bach, *Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing*. Biochim. Biophys. Acta, 1990. **1087**(3): S. 265-92.
49. Sillekens, P.T.G., *et al.*, Nucleic Acids Res., 1988. **16**: S. 8307-8321.
50. Sillekens, P.T.G., *et al.*, *cDNA cloning of the human U1 snRNA-associated A protein: Extensive homology between U1 and U2 snRNP-associated proteins*. EMBO J., 1987. **6**: S. 3841-3848.
51. Theissen, H., *et al.*, *Cloning of the human cDNA for the U1 RNA-associated 70K protein*. EMBO J., 1986. **5**(12): S. 3209-17.
52. Sillekens, P.T.G., *et al.*, *Molecular cloning of the cDNA for the human U2 snRNA-specific A' protein*. Nucleic Acids Res., 1989. **17**: S. 1893-1906.
53. Habets, W.J.e.a., *Analysis of a cDNA clone expressing a human autoimmune antigen - Full-length sequence of the U2 small nuclear RNA-associated B'' antigen*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1987. **84**: S. 2421-2425.
54. Behrens, S.E., *et al.*, *Small nuclear ribonucleoprotein (RNP) U2 contains numerous additional proteins and has a bipartite RNP structure under splicing conditions*. Mol. Cell. Biol., 1993. **13**(1): S. 307-19.
55. Brosi, R., *et al.*, *Interaction of mammalian splicing factor SF3a with U2 snRNP and relation of its 60-kD subunit to yeast PRP9*. Science, 1993. **262**(5130): S. 102-5.
56. Bennett, M. und R. Reed, *Correspondence between a mammalian spliceosome component and an essential yeast splicing factor*. Science, 1993. **262**(5130): S. 105-8.
57. Krämer, A., *et al.*, *Mammalian splicing factor SF3a120 represents a new member of the SURP family of proteins and is homologous to the essential splicing factor Prp21p of Saccharomyces cerevisiae*. RNA, 1995. **1**: S. 260-272.
58. Champion-Arnaud, P. und R. Reed, *The prespliceosome components SAP 49 and SAP 145 interact in a complex implicated in tethering U2 snRNP to the branch site*. Genes Dev., 1994. **8**(16): S. 1974-83.
59. Gozani, O., R. Feld und R. Reed, *Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A*. Genes Dev., 1996. **10**(2): S. 233-43.
60. Wang, C., *et al.*, *Phosphorylation of spliceosomal protein SAP 155 coupled with splicing catalysis*. Genes Dev., 1998. **12**(10): S. 1409-14.
61. Anderson, G.J., *et al.*, *Conservation between yeast and man of a protein associated with U5 small nuclear ribonucleoprotein*. Nature, 1989. **342**(6251): S. 819-21.
62. Pinto, A.L. und J.A. Steitz, *The mammalian analogue of the yeast PRP8 splicing protein is present in the U4/5/6 small nuclear ribonucleoprotein particle and the spliceosome*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1989. **86**(22): S. 8742-6.
63. Lauber, J., *et al.*, *The HeLa 200 kDa U5 snRNP-specific protein and its homologue in Saccharomyces cerevisiae are members of the DEXH-box protein family of putative RNA helicases*. EMBO J., 1996. **15**(15): S. 4001-15.
64. Bach, M., G. Winkelmann und R. Lührmann, *20S small nuclear ribonucleoprotein U5 shows a surprisingly complex protein composition*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1989. **86**(16): S. 6038-42.
65. Teigelkamp, S., *et al.*, *The human U5 snRNP-specific 100-kD protein is an RS domain-containing, putative RNA helicase with significant homology to the yeast splicing factor Prp28p*. RNA, 1997. **3**(11): S. 1313-26.
66. Achsel, T., *et al.*, *The human U5-220kD protein (hPrp8) forms a stable RNA-free complex with several U5-specific proteins, including an RNA unwindase, a homologue of ribosomal elongation factor EF-2, and a novel WD-40 protein*. Mol. Cell. Biol., 1998. **18**(11): S. 6756-66.
67. Fetzter, S., *et al.*, *The [U4/U6.U5] tri-snRNP-specific 27K protein is a novel SR protein that can be phosphorylated by the snRNP-associated protein kinase*. RNA, 1997. **3**(4): S. 344-55.
68. Reuter, K., *et al.*, *Crystal structure of a novel thioredoxin-like U5 snRNP-protein*. J. Mol. Biol., 1999. **in press**.
69. Lauber, J., *et al.*, *The human U4/U6 snRNP contains 60 and 90kD proteins that are structurally homologous to the yeast splicing factors Prp4p and Prp3p [published erratum appears in RNA 1997 Oct;3(10):1204-6]*. RNA, 1997. **3**(8): S. 926-41.

70. Teigelkamp, S., *et al.*, *The 20kD protein of human [U4/U6.U5] tri-snRNPs is a novel cyclophilin that forms a complex with the U4/U6-specific 60kD and 90kD proteins.* RNA, 1998. **4**(2): S. 127-41.
71. Horowitz, D.S., R. Kobayashi und A.R. Krainer, *A new cyclophilin and the human homologues of yeast Prp3 and Prp4 form a complex associated with U4/U6 snRNPs.* RNA, 1997. **3**(12): S. 1374-87.
72. Nottrott, S., *et al.*, *Functional interaction of a novel 15.5kD [U4/U6.U5] tri-snRNP protein with the 5'-stem-loop of U4 snRNA.* EMBO J., 1999. in Druck.
73. Price, S.R., P.R. Evans und K. Nagai, *Crystal structure of the spliceosomal U2B''-U2A' protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA.* Nature, 1998. **394**(6694): S. 645-50.
74. Dix, I., *et al.*, *Protein-RNA interactions in the U5 snRNP of Saccharomyces cerevisiae.* RNA, 1998. **4**: S. 1239-1250.
75. Rymond, B.C., *Convergent transcripts of the yeast PRP38-SMD1 locus encode two essential splicing factors, including the D1 core polypeptide of small nuclear ribonucleoprotein particles.* Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1993. **90**: S. 848-852.
76. Roy, J., *et al.*, *Structurally related but functionally distinct yeast Sm D core small nuclear ribonucleoprotein particle proteins.* Mol. Cell. Biol., 1995. **15**(1): S. 445-55.
77. Bordonné, R. und I. Tarassov, *The yeast SME1 gene encodes the homologue of the human E core protein.* Gene, 1996. **176**(1-2): S. 111-7.
78. Séraphin, B., *Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs.* EMBO J., 1995. **14**(9): S. 2089-98.
79. Cooper, M., L.H. Johnston und J.D. Beggs, *Identification and characterization of Uss1p (Sdb23p): a novel U6 snRNA-associated protein with significant similarity to core proteins of small nuclear ribonucleoproteins.* EMBO J., 1995. **14**(9): S. 2066-75.
80. Shannon, K.W. und C. Guthrie, *Suppressors of a U4 snRNA mutation define a novel U6 snRNP protein with RNA-binding motifs.* Genes Dev., 1991. **5**(5): S. 773-85.
81. Liao, X.C., J. Tang und M. Rosbash, *An enhancer screen identifies a gene that encodes the yeast U1 snRNP A protein: implications for snRNP protein function in pre-mRNA splicing.* Genes Dev., 1993. **7**(3): S. 419-28.
82. Smith, V. und B.G. Barrell, *Cloning of a yeast U1 snRNP 70K protein homologue: functional conservation of an RNA-binding domain between humans and yeast.* EMBO J., 1991. **10**(9): S. 2627-34.
83. Lockhart, S.R. und B.C. Rymond, *Commitment of Yeast Pre-mRNA to the Splicing Pathway Requires a Novel U1 Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide, Prp39p.* Mol. Cell. Biol., 1994. **14**(6): S. 3623-33.
84. Kao, H.Y. und P.G. Siliciano, *Identification of Prp40, a novel essential yeast splicing factor associated with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle.* Mol. Cell. Biol., 1996. **16**(3): S. 960-7.
85. Polycarpou-Schwarz, M., *et al.*, *Drosophila SNF/D25 combines the functions of the two snRNP proteins U1A and U2B' that are encoded separately in human, potato, and yeast.* RNA, 1996. **2**(1): S. 11-23.
86. Abovich, N., P. Legrain und M. Rosbash, *The yeast PRP6 gene encodes a U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP) protein, and the PRP9 gene encodes a protein required for U2 snRNP binding.* Mol. Cell. Biol., 1990. **10**(12): S. 6417-25.
87. Ruby, S.W., T.H. Chang und J. Abelson, *Four yeast spliceosomal proteins (PRP5, PRP9, PRP11, and PRP21) interact to promote U2 snRNP binding to pre-mRNA.* Genes Dev., 1993. **7**(10): S. 1909-25.
88. Arenas, J.E. und J.N. Abelson, *The Saccharomyces cerevisiae PRP21 gene product is an integral component of the prespliceosome.* PNAS, 1993. **90**(14): S. 6771-5.
89. Wells, S.E., *et al.*, *CUS1, a suppressor of cold-sensitive U2 snRNA mutations, is a novel yeast splicing factor homologous to human SAP 145.* Genes Dev., 1996. **10**(2): S. 220-32.
90. Lossky, M., *et al.*, *Identification of a yeast snRNP protein and detection of snRNP-snRNP interactions.* Cell, 1987. **51**(6): S. 1019-26.
91. Banroques, J. und J.N. Abelson, *PRP4: a protein of the yeast U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle.* Mol. Cell. Biol., 1989. **9**(9): S. 3710-9.
92. Bjorn, S.P., *et al.*, *PRP4 (RNA4) from Saccharomyces cerevisiae: its gene product is associated with the U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle.* Mol. Cell. Biol., 1989. **9**(9): S. 3698-709.
93. Noble, S.M. und C. Guthrie, *Identification of novel genes required for yeast pre-mRNA splicing by means of cold-sensitive mutations.* Genetics, 1996. **143**(1): S. 67-80.

94. Xu, D., *et al.*, An RNA-dependent ATPase associated with U2/U6 snRNAs in pre-mRNA splicing. *Nature*, 1996. **381**(6584): S. 709-13.
95. Lin, J. und J.J. Rossi, Identification and characterization of yeast mutants that overcome an experimentally introduced block to splicing at the 3' splice site. *RNA*, 1996. **2**(8): S. 835-48.
96. Horowitz, D.S. und J. Abelson, A U5 small nuclear ribonucleoprotein particle protein involved only in the second step of pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 1993. **13**(5): S. 2959-70.
97. Blanton, S., A. Srinivasan und B.C. Rymond, PRP38 encodes a yeast protein required for pre-mRNA splicing and maintenance of stable U6 small nuclear RNA levels. *Mol. Cell. Biol.*, 1992. **12**: S. 3939-47.
98. Xie, J., *et al.*, Progression through the spliceosome cycle requires Prp38p function for U4/U6 snRNA dissociation. *EMBO J.*, 1998. **17**(10): S. 2938-46.
99. Caspary, F. und B. Séraphin, The yeast U2A/U2B complex is required for pre-spliceosome formation. *EMBO J.*, 1998. **17**(21): S. 6348-58.
100. Igel, H., *et al.*, Conservation of structure and subunit interactions in yeast homologues of splicing factor 3b (SF3b) subunits. *RNA*, 1998. **4**(1): S. 1-10.
101. Anthony, J.G., E.M. Weidenhammer und J.L. Woolford, Jr., The yeast Prp3 protein is a U4/U6 snRNP protein necessary for integrity of the U4/U6 snRNP and the U4/U6.U5 tri-snRNP. *RNA*, 1997. **3**(10): S. 1143-52.
102. Weidenhammer, E.M., M. Ruiz-Noriega und J.L. Woolford, Jr., Prp3Ip promotes the association of the U4/U6 x U5 tri-snRNP with prespliceosomes to form spliceosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 1997. **17**(7): S. 3580-8.
103. Pannone, B.K., D. Xue und S.L. Wolin, A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: evidence that the La protein is a molecular chaperone for RNA polymerase III transcripts. *EMBO J.*, 1998. **17**(24): S. 7442-53.
104. Nelissen, R.L., *et al.*, Zinc finger-like structure in U1-specific protein C is essential for specific binding to U1 snRNP. *Nucleic Acids Res.*, 1991. **19**(3): S. 449-54.
105. Jandrositz, A. und C. Guthrie, Evidence for a Prp24 binding site in U6 snRNA and in a putative intermediate in the annealing of U6 and U4 snRNAs. *EMBO J.*, 1995. **14**(4): S. 820-32.
106. Das, A.K., P.T.W. Cohen und D. Barford, The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.*, 1998. **17**: S. 1192-1199.
107. Fuller-Pace, F.V., RNA helicases: modulators of RNA structure. *Trends Cell Biol.*, 1994. **4**: S. 271-274.
108. O'Day, C.L., G. Dalbadie-McFarlund und J. Abelson, The *Saccharomyces cerevisiae* Prp5 protein has RNA-dependent ATPase activity with specificity for U2 small nuclear RNA. *J. Biol. Chem.*, 1996. **271**(52): S. 33261-7.
109. Staley, J.P. und C. Guthrie, An RNA switch at the 5' splice site requires ATP and the DEAD box protein Prp28p. *Mol. Cell*, 1999. **3**(1): S. 55-64.
110. Raghunathan, P.L. und C. Guthrie, RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEIH-box splicing factor Brr2. *Curr. Biol.*, 1998. **8**: S. 847-855.
111. Plumpton, M., M. McGarvey und J.D. Beggs, A dominant negative mutation in the conserved RNA helicase motif 'SAT' causes splicing factor PRP2 to stall in spliceosomes. *EMBO J.*, 1994. **13**(4): S. 879-87.
112. Umen, J.G. und C. Guthrie, Prp16p, Slu7p, and Prp8p interact with the 3' splice site in two distinct stages during the second catalytic step of pre-mRNA splicing. *RNA*, 1995. **1**(6): S. 584-97.
113. Company, M., J. Arenas und J. Abelson, Requirement of the RNA helicase-like protein PRP22 for release of messenger RNA from spliceosomes. *Nature*, 1991. **349**(6309): S. 487-93.
114. Wagner, J.D., *et al.*, The DEAH-box protein PRP22 is an ATPase that mediates ATP-dependent mRNA release from the spliceosome and unwinds RNA duplexes. *EMBO J.*, 1998. **17**(10): S. 2926-37.
115. Arenas, J.E. und J.N. Abelson, Prp43: An RNA helicase-like factor involved in spliceosome disassembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997. **94**(22): S. 11798-802.
116. Valcárcel, J., *et al.*, Interaction of U2AF65 RS region with pre-mRNA branch point and promotion of base pairing with U2 snRNA. *Science*, 1996. **273**(5282): S. 1706-9.
117. Fu, X.D., The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA*, 1995. **1**: S. 663-680.
118. Abovich, N. und M. Rosbash, Cross-intron bridging interactions in the yeast commitment complex are conserved in mammals. *Cell*, 1997. **89**(3): S. 403-12.
119. Will, C.L. und R. Lührmann, Protein functions in pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1997. **9**(3): S. 320-8.

120. Wu, J.Y. und T. Maniatis, *Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing*. Cell, 1993. **75**(6): S. 1061-70.
121. Berglund, J.A., et al., *The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAAC*. Cell, 1997. **89**(5): S. 781-7.
122. Abovich, N., X.C. Liao und M. Rosbash, *The yeast MUD2 protein: an interaction with PRP11 defines a bridge between commitment complexes and U2 snRNP addition*. Genes Dev., 1994. **8**(7): S. 843-54.
123. Fabrizio, P., et al., *Isolation of S. cerevisiae snRNPs: comparison of U1 and U4/U6.U5 to their human counterparts*. Science, 1994. **264**(5156): S. 261-5.
124. Mann, M. und M. Wilm, *Electrospray mass spectrometry for protein characterization*. Trends Biochem. Sci., 1995. **20**(219-223).
125. Wilm, M., et al., *Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano electrospray mass spectrometry*. Nature, 1996. **379**: S. 466-469.
126. Mewes, H.W., et al., *Overview of the yeast genome*. Nature, 1997. **387**: S. 7-65.
127. Sikorski, R.S. und P. Hieter, *A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1989. **122**(1): S. 19-27.
128. Gottschalk, A., et al., *Identification by mass spectrometry and functional analysis of novel proteins of the yeast [U4/U6.U5] tri-snRNP*. EMBO J., 1999. **18**(16): S. 4535-4548.
129. Ayadi, L., M. Miller und J. Banroques, *Mutations within the yeast U4/U6 snRNP protein Prp4 affect a late stage of spliceosome assembly*. RNA, 1997. **3**(2): S. 197-209.
130. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem, 1981. **112**(2): S. 195-203.
131. Sambrook, J., E.F. Fritsch und T. Maniatis, *Molecular Cloning - a laboratory manual*. 2 ed, ed. N. Ford und C. Nolan. 1989, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
132. Schoenle, E.J., L.D. Adams und D.W. Sammons, *Insulin-induced rapid decrease of a major protein in fat cell plasma membranes*. J Biol Chem, 1984. **259**(19): S. 12112-6.
133. Li, Z. und D.A. Brow, *A rapid assay for quantitative detection of specific RNAs*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(19): S. 4645-6.
134. Cohen, S.N., A.C. Chang und L. Hsu, *Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(8): S. 2110-4.
135. Birnboim, H.C. und J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): S. 1513-23.
136. Maxam, A.M. und W. Gilbert, *A new method for sequencing DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(2): S. 560-4.
137. Becker, D.M. und L. Guarente, *High-efficiency transformation of yeast by electroporation*, in *Guide to yeast genetics and molecular biology*, C. Guthrie und G.R. Fink, Editors. 1991, Academic Press, Inc.: San Diego, California. S. 182-187.
138. Rothstein, R., *Targeting, Disruption, Replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast*, in *Guide to yeast genetics and molecular biology*, C. Guthrie und G.R. Fink, Editors. 1991, Academic Press, Inc.: San Diego, California. S. 281-301.
139. Lee, F.J., *Modified protocol for yeast DNA mini-preparation*. Biotechniques, 1992. **12**(5): S. 677.
140. Sherman, F. und J. Hicks, *Micromanipulation and dissection of asci*, in *Guide to yeast genetics and molecular biology*, C. Guthrie und G.R. Fink, Editors. 1991, Academic Press, Inc.: San Diego, California. S. 21-38.
141. Schneider, J.C. und L. Guarente, *Vectors for expression of cloned genes in yeast: Regulation, overproduction and underproduction*, in *Guide to yeast genetics and molecular biology*, C. Guthrie und G.R. Fink, Editors. 1991, Academic Press, Inc.: San Diego, California. S. 373-388.
142. Puig, O., et al., *New constructs and strategies for efficient PCR-based gene manipulations in yeast*. Yeast, 1998. **14**(12): S. 1139-46.
143. Lin, R.J., et al., *Yeast mRNA splicing in vitro*. J. Biol. Chem., 1985. **260**(27): S. 14780-92.

144. Umen, J.G. und C. Guthrie, *A novel role for a U5 snRNP protein in 3' splice site selection*. Genes Dev., 1995. **9**(7): S. 855-68.
145. Grabowski, P.J. und P.A. Sharp, *Affinity chromatography of splicing complexes: U2, U5, and U4 + U6 small nuclear ribonucleoprotein particles in the spliceosome*. Science, 1986. **233**(4770): S. 1294-9.
146. McPheeters, D.S., P. Fabrizio und J. Abelson, *In vitro reconstitution of functional yeast U2 snRNPs*. Genes Dev., 1989. **3**(12B): S. 2124-36.
147. Fabrizio, P., D.S. McPheeters und J. Abelson, *In vitro assembly of yeast U6 snRNP: a functional assay*. Genes Dev., 1989. **3**(12B): S. 2137-50.
148. Edman, P., *Method for the determination of the amino acid sequence in peptides*. Acta Chem. Scand., 1950. **4**: S. 283-293.
149. Wilm, M. und M. Mann, *Analytical properties of the nano electrospray ion source*. Anal. Chem., 1996. **68**: S. 1-8.
150. Karas, M. und F. Hillenkamp, *Laser desorption ionisation of peptides with molecular masses exceeding 10000 daltons*. Anal. Chem., 1988. **60**: S. 2299-2301.
151. Mann, M. und M. Wilm, *Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags*. Anal. Chem., 1994. **66**(24): S. 4390-9.
152. Kastner, B., et al., *Structure of the small nuclear RNP particle U1: identification of the two structural protuberances with RNP-antigens A and 70K*. J. Cell Biol., 1992. **116**(4): S. 839-49.
153. Gottschalk, A., et al., *A comprehensive biochemical and genetic analysis of the yeast U1 snRNP reveals five novel proteins*. RNA, 1998. **4**(4): S. 374-93.
154. Fortes, P., et al., *Luc7p, a novel yeast U1 snRNP protein with a role in 5'-splicesite recognition*. Genes Dev. ?, 1999. eingereicht.
155. Ekwall, K., et al., *The NAM8 gene in Saccharomyces cerevisiae encodes a protein with putative RNA binding motifs and acts as a suppressor of mitochondrial splicing deficiencies when overexpressed*. Mol. Gen. Genet., 1992. **233**: S. 136-144.
156. Ogawa, H., et al., *Functions of the yeast meiotic recombination genes, MRE11 and MRE2*. Adv. Biophys., 1995. **31**: S. 67-76.
157. Nakagawa, T. und H. Ogawa, *Involvement of the MRE2 gene of yeast in formation of meiosis-specific double-strand breaks and crossover recombination through RNA splicing*. Genes Cells, 1997. **2**: S. 65-79.
158. Nandabalan, K., L. Price und G.S. Roeder, *Mutations in U1 snRNA bypass the requirement for a cell-type specific RNA splicing factor*. Cell, 1993. **73**: S. 407-415.
159. Engebrecht, J., K. Voelkel-Meimann und K.S. Roeder, *Meiosis-specific RNA-splicing in yeast*. Cell, 1991. **66**: S. 1257-1268.
160. Nandabalan, K. und G.S. Roeder, *Binding of a cell-type specific RNA splicing factor to its target regulatory sequence*. Mol. Cell. Biol., 1995. **15**: S. 1953-1960.
161. Lee, M.S., M. Henry und P.A. Silver, *A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export*. Genes Dev., 1996. **10**: S. 1233-1246.
162. Siebel, C.W. und C. Guthrie, *The essential yeast RNA binding protein Npl3p is methylated*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1996. **93**: S. 13641-13646.
163. Russel, I.D. und D. Tollervey, *NOP3 is an essential yeast protein which is required for pre-rRNA processing*. J. Cell. Biol., 1992. **119**: S. 737-747.
164. Flach, J., et al., *A yeast RNA-binding protein shuttles between the nucleus and the cytoplasm*. Mol. Cell. Biol., 1994. **14**: S. 8399-8407.
165. Siebel, C.W., et al., *Conservation in budding yeast of a kinase specific for SR splicing factors*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1999. **96**: S. 5440-5445.
166. Birney, E., S. Kumar und A.R. Krainer, *Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: Conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors*. Nucleic Acids Res., 1993. **21**: S. 5803-5816.
167. Russel, I.D. und D. Tollervey, *Yeast Nop3p has structural and functional similarities to mammalian pre-mRNA splicing proteins*. Eur. J. Cell Biol., 1995. **66**: S. 293-301.
168. McLean, M.R. und B.C. Rymond, *Yeast pre-mRNA splicing requires a pair of U1 snRNP-associated tetratricopeptide repeat proteins*. Mol. Cell. Biol., 1998. **18**(1): S. 353-60.

169. Teigelkamp, S., E. Whittaker und J.D. Beggs, *Interaction of the yeast splicing factor PRP8 with substrate RNA during both steps of splicing*. Nucleic Acids Res., 1995. **23**(3): S. 320-6.
170. Salgado-Garrido, J., et al., *Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin*. EMBO J., 1999. **18**(12): S. 3451-3462.
171. Mayes, A.E., et al., *Characterization of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA*. EMBO J., 1999. **18**(15): S. 4321-4331.
172. Achsel, T., et al., *A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro*. EMBO J., 1999. **18**(20).
173. Neubauer, G., et al., *Identification of the proteins of the yeast U1 small nuclear ribonucleoprotein complex by mass spectrometry*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1997. **94**(2): S. 385-90.
174. Berry, L.D. und K.L. Gould, *Fission yeast dim1(+) encodes a functionally conserved polypeptide essential for mitosis*. J. Cell Biol., 1997. **137**(6): S. 1337-54.
175. Chen, E.J., et al., *A link between secretion and pre-mRNA processing defects in Saccharomyces cerevisiae and the identification of a novel splicing gene, RSE1*. Mol. Cell. Biol., 1998. **18**(12): S. 7139-46.
176. Rechsteiner, M. und S.W. Rogers, *PEST sequences and regulation by proteolysis*. Trends. Biochem. Sci., 1996. **21**: S. 267-271.
177. Lybarger, S., et al., *Elevated levels of a U4/U6.U5 snRNP-associated protein, Spp381p, rescue a mutant defective in spliceosome maturation*. Mol. Cell. Biol., 1999. **19**(1): S. 577-84.
178. Berry, L.D., et al., *The schizosaccharomyces pombe dim1(+) gene interacts with the anaphase- promoting complex or cyclosome (APC/C) component lid1(+) and is required for APC/C function*. Mol. Cell. Biol., 1999. **19**(4): S. 2535-46.
179. Koonin, E.V., P. Bork und C. Sander, *A novel RNA-binding motif in omnipotent suppressors of translation termination, ribosomal proteins and a ribosome modification enzyme?* Nucleic Acids Res., 1994. **22**(11): S. 2166-7.
180. Tarn, W.Y., K.R. Lee und S.C. Cheng, *Yeast precursor mRNA processing protein PRP19 associates with the spliceosome concomitant with or just after dissociation of U4 small nuclear RNA*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1993. **90**(22): S. 10821-5.
181. Nakazawa, N., S. Harashima und Y. Oshima, *AAR2, a gene for splicing pre-mRNA of the MATa1 cistron in cell type control of Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol., 1991. **11**(11): S. 5693-700.
182. Caspary, F., et al., *Partial purification of the yeast U2 snRNP reveals a novel yeast pre- mRNA splicing factor required for pre-spliceosome assembly*. EMBO J., 1999. **18**(12): S. 3463-3474.
183. Tang, J. und M. Rosbash, *Characterization of yeast U1 snRNP A protein: identification of the N- terminal RNA binding domain (RBD) binding site and evidence that the C- terminal RBD functions in splicing*. RNA, 1996. **2**(10): S. 1058-70.
184. Kao, H.Y. und P.G. Siliciano, *The yeast homolog of the U1 snRNP protein 70K is encoded by the SNP1 gene*. Nucleic Acids Res., 1992. **20**(15): S. 4009-13.
185. Puig, O., et al., *Interaction of the U1 snRNP with nonconserved intronic sequences affects 5' splice site selection*. Genes Dev., 1999. **13**: S. 569-580.
186. Crispino, J.D., B.J. Blencowe und P.A. Sharp, *Complementation by SR proteins of pre-mRNA splicing reactions depleted of U1 snRNP*. Science, 1994. **265**(5180): S. 1866-9.
187. Boeck, R., et al., *Capped mRNA degradation intermediates accumulate in the yeast spb8-2 mutant*. Mol. Cell. Biol., 1998. **18**(9): S. 5062-72.
188. Stevens, S.W. und J. Abelson, *Purification of the yeast U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein particle and identification of its proteins*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1999. **96**: S. 7226-7231.
189. Urushiyama, S., T. Tani und Y. Ohshima, *The prp1+ gene required for pre-mRNA splicing in Schizosaccharomyces pombe encodes a protein that contains TPR motifs and is similar to Prp6p of budding yeast*. Genetics, 1997. **147**(1): S. 101-15.
190. Seghezzi, W., et al., *Cyclin E associates with components of the pre-mRNA splicing machinery in mammalian cells*. Mol. Cell. Biol., 1998. **18**(8): S. 4526-36.
191. Kim, E., et al., *Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA*. J. Cell Biol., 1997. **136**(1): S. 19-28.

192. Jumaa, H., J.L. Guenet und P.J. Nielsen, *Regulated expression and RNA processing of transcripts from the Srp20 splicing factor gene during the cell cycle*. Mol. Cell. Biol., 1997. **17**(6): S. 3116-24.
193. Bordonné, R., *et al.*, *Domains of yeast U4 spliceosomal RNA required for PRP4 protein binding, snRNP-snRNP interactions, and pre-mRNA splicing in vivo*. Genes Dev., 1990. **4**(7): S. 1185-96.
194. Konarska, M.M. und P.A. Sharp, *Association of U2, U4, U5, and U6 small nuclear ribonucleoproteins in a spliceosome-type complex in absence of precursor RNA*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1988. **85**(15): S. 5459-62.
195. Black, D.L. und A.L. Pinto, *U5 small nuclear ribonucleoprotein: RNA structure analysis and ATP-dependent interaction with U4/U6*. Mol. Cell. Biol., 1989. **9**(8): S. 3350-3359.
196. Lagerbauer, B., T. Achsel und R. Lührmann, *The human U5-200kD DEXH-box protein unwinds U4/U6 RNA duplexes in vitro*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1998. **95**(8): S. 4188-92.
197. Wassarman, D.A. und J.A. Steitz, *Interactions of small nuclear RNAs with precursor messenger RNA during in vitro splicing*. Science, 1992. **257**(5078): S. 1918-25.
198. Kim, D.H. und J.J. Rossi, *The first ATPase domain of the yeast 246-kDa protein is required for in vivo unwinding of the U4/U6 duplex*. RNA, 1999. **5**(7): S. 959-71.
199. Keller, W., *et al.*, *Cleavage and polyadenylation factor CPF specifically interacts with the pre-mRNA 3' processing signal AAUAAA*. EMBO J., 1991. **10**: S. 4241-4249.
200. Dix, I., *et al.*, *The identification and characterization of a novel splicing protein, Isy1p, of Saccharomyces cerevisiae*. RNA, 1999. **5**: S. 360-368.
201. Neubauer, G., King, A., Rappsilber, J., Calvio, C., Watson, M., Ajuh, P., Sleeman, J., Lamond, A. und Mann, M., *Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex*. Nat. Genet., 1998. **20**: S. 46-50.

7 VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

A	Ampère	MW	Molekulargewicht
A	Adenin	n	nano
α	anti	NET	Natriumchlorid/EDTA/TRIS-Puffer
AA	Acrylamid	nt	Nukleotid
Abb.	Abbildung	NTA	Nitrilo-triacetic acid
AK	Antikörper	OD	Optische Dichte
AMP	Ampicillin	OAc	Acetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat	p	pico
ATP	Adenosintriphosphat	<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
BAA	N,N'-Methylen-bis-Acrylamid	PAA	Polyacrylamid
bp	Basenpaare	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
BP	Branchpoint	PBS	Phosphate Buffered Saline
BSA	Rinderserumalbumin	PCA	Phenol, Chloroform,
C	Cytidin		Isoamylalkohol Lösung
CC	Commitment-Komplex	PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	PEG	Polyethylenglycol
Ci	Curie	pH	negativer 10er-Logarithmus der
cpm	counts per minute		Protonenkonzentration
CTP	Cytosintriphosphat	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Da	Dalton	prä-mRNA	Vorläufer-mRNA
d	deoxy	prp	pre-mRNA processing
dd	bidestilliert	RBD	RNA-Bindungs-Domäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat	RNA	Ribonukleinsäure
DEXD/H	Konsensusdomäne der ATP-abhängigen	RNase	Ribonuklease
	RNA-Helikasen	RNasin	Ribonuklease-Inhibitor
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNP	Ribonukleoprotein Partikel
DNA	Deoxyribonukleinsäure	rRNA	ribosomale RNA
DNase	Deoxyribonuklease	tRNA	transfer-RNA
DTT	Dithiothreitol	S	Svedberg-Einheit
ECL	enhanced chemiluminescence	SAP	Spleißosom-assoziiertes Protein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
EM	Elektronenmikroskop(ie)	SDS	Natriumdodecylsulfat
ES/MS	Electrospray-Massenspektrometrie	sn	small nuclear
EtOH	Ethanol	sno	small nucleolar
f	femto	SR	serin-arginin(-reich)
G	Guanin	ss	single-stranded
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-	T	Thymin
	Dehydrogenase	Tab.	Tabelle
GpppG	Guanosintriphosphat-RNA-	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Lösung
	Kappenstruktur	TBE	Tris-Borat-EDTA-Lösung
GTP	Guanosintriphosphat	TBS	Tris-buffered saline
h	Stunde	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
HCl	Salzsäure	TMG	Trimethylguanin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-	TOF	time of flight
	ethansulfonsäure	TPR	Tetratrico-peptide-repeat
HSP	Hitzeschock-Protein	TRIS/HCl	Tris-(hydroxymethyl)-
IgG	Immunglobulin der Klasse G		aminomethan-Hydrochlorid
kDa	kilo-Dalton	tRNA	transfer RNA
KOH	Kaliumhydroxid	TTP	Thymintriphosphat
LB-Medium	Luria-Bertani Medium	U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
	(Bakterienmedium)	U	Uridin
M	molar	U/min	Umdrehungen pro Minute
m	milli	UsnRNP	uridine-rich small nuclear
μ	mikro		ribonucleoprotein particle
mAK	monoklonaler Antikörper	UTP	Uridintriphosphat
MALDI	matrix assisted laser desorption	UV	Ultraviolett
	ionisation	V	Volt
MG, MW, M _r	Molekulargewicht	v/v	volume over volume
m ₃ G	N ² ,N ² ,N ⁷ -Trimethylguanin	WD	Sequenzmotiv der β -Untereinheiten
m ⁷ G	N ⁷ -Monomethylguanin		trimerer G-Proteine
min	Minute	w/v	weight over volume
mol	Mol	WW	WW-Domäne (Proteinsequenzmotiv)
mRNA	messenger RNA	y	Hefe (als Präfix)
		YPD	Yeast-Extract/Pepton/Dextrose
			(Hefekulturmedium)

8 DANKSAGUNG

Ich möchte mich hiermit bei den zahlreichen Personen bedanken, die auf verschiedenste Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mir währenddessen eine gute Zeit bereitet haben. Insbesondere will ich hier die folgenden Personen erwähnen, allen anderen, die hier vielleicht nicht aufgeführt sind, danke ich natürlich ebenfalls:

- Mein Dank gilt Prof. Dr. Reinhard Lührmann, der mir die Bearbeitung dieses interessanten Themas ermöglichte und mir stets mit gutem Rat, viel Interesse und Engagement zur Seite stand.
- Genauso möchte ich mich bei Prof. Dr. Helmut Kindl für die gute externe Betreuung der Arbeit bedanken.
- Vielen Dank an Patrizia Fabrizio, die mir mit viel Rat und Tat, Plasmiden und sonstigem Hefe-Zeugs immer geholfen hat. Danke für die stete Bereitschaft zur Diskussion auch magerer Ergebnisse, das geduldige Lesen zahlloser Manuskriptversionen und überhaupt !
- Gitte Neubauer, ohne die diese Arbeit unmöglich gewesen wäre, bin ich für das Sequenzieren endlos vieler Peptide zu besonderem Dank verpflichtet.
- Ein Dankeschön an Berthold Kastner und Beate Rückert für viele Mann- und Frauenstunden am Elektronenmikroskop !
- Mein Dank an Barbara und Sabine für die vielen Fotos !
- Henning, Steffi, Dagmar M., Tilmann, Dagmar O. und Hans-Peter: Danke fürs Korrekturlesen ! (moment, da kommt noch mehr ...)
- Achim, Bernhard, Claudia, Christine, Cindy, Dagmar (large), Dagmar (medium), Dagmar (small), Dierk, Genia, Henning, Hero, Ivan, Jochen, Klaus H., Luciano, Nele, Nick, Olga, Prakash, Steffi, Thomas, Tilmann, Vera, Veronica und Xavier: VIELEN DANK für eine sehr sehr sehr lustige Zeit im Labor, im Mexicali, im Quodlibet, auf Kreta, La Palma und wo sonst noch, und natürlich für zahllose durchgemachte Partynächte !!!
- Axel, Bettina, Elke, Gaby, Hans-Peter, Holger, Klaus R., Peter, Ralf, Silke, Sunbin, Udo, Uli, Verena und Winnie danke ich ebenso für eine gute und kollegiale Arbeitsatmosphäre, für Rat und Tips in allen Lebenslagen und nicht so viele durchgemachte Partynächte !
- Danke an Irene und ALDI, ohne die ich diese Arbeit mit der Hand hätte schreiben müssen!
- Und ein ganz besonderes Dankeschön (eins reicht garnicht) an Annette für ihre Liebe, mit der sie mich, wenn nötig, immer wieder aufbaut !!!

9 ERKLÄRUNG

Ich versichere, daß ich die hier vorliegende Dissertation selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 24. September 1999

A handwritten signature in black ink, reading "Alexander Gohndach". The signature is written in a cursive style with a large initial 'A' and 'G'.